



Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Proposta de modelo de exposição humana à
saxitoxina em águas de recreação e de
abastecimento público do reservatório
Itupararanga**

Luciana Haipek Mosolino Lerche

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de
pós-graduação em Saúde Pública para obtenção do grau
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini

SÃO PAULO
2018

Proposta de modelo de exposição humana à saxitoxina em águas de recreação e de abastecimento público do reservatório Itupararanga

Luciana Haipek Mosolino Lerche

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini

Versão Revisada

**SÃO PAULO
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Mosolino Lerche, Luciana Haipek

Proposta de modelo de exposição humana à saxitoxina em águas de recreação e de abastecimento público do reservatório Itupararanga / Luciana Haipek Mosolino Lerche; orientadora Maria Tereza Pepe Razzolini. -- São Paulo, 2018.

97 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Cianobactérias. 2. Cylindrospermopsis. 3. Cenário de exposição. 4. Saxitoxina. I. Razzolini, Maria Tereza Pepe, orient. II. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, que contribuíram de maneira indescritível à realização de todos os meus sonhos, e ao meu amado marido, que permaneceu ao meu lado durante toda a sua realização.

AGRADECIMENTOS

À CETESB, pois graças a essa Companhia, foi possível conquistar muitos bens em minha vida, principalmente bens pessoais, com a presença inestimável de todos os meus amigos e com o crescimento pessoal e intelectual.

À minha orientadora, Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini, por aceitar esse desafio comigo. Sem ela não teria sido possível a realização dessa dissertação.

Às minhas gerentes, Dr^a Maria do Carmo Carvalho, Dr^a Marta Condé Lamparelli e Dr^a Maria Inês Sato, por todas as colaborações, conselhos, compreensões e pelo carinho.

Às minhas colegas Denise e Mônica, que também contribuíram com artigos e conselhos.

À Lesley D'Anglada, da U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency), pelas considerações.

À Dr^a Rúbia Kuno e à Mestre Simone Harue Kimura Takeda, da Divisão de Toxicidade Humana e Saúde Ambiental da CETESB, pelos conselhos, artigos e pela paciência quando precisei de ajuda.

À querida Margot, gerente da biblioteca da CETESB, pela paciência e pela amizade.

À amiga e geógrafa Carmen Lucia Midaglia, do setor de Águas Interiores da CETESB, pelos mapas, pelos conselhos e pelo apoio.

Ao Nelson Menegon Júnior, da Divisão de Águas e Solo da CETESB, pela atenção e ajuda no esclarecimento de questões relacionadas à captação de água.

Aos amigos da Bacteriologia da CETESB, pelo apoio e pelo carinho.

Às minhas amigas Veridiana, Fernanda, Francisca, Helena, Ana Tereza, Elizabete, Regina, Lygia, Alexandra, Mara Fernandes e Karla, por todo o apoio.

RESUMO

MOSOLINO LERCHE, L. H. **Proposta de modelo de exposição humana à saxitoxina em águas de recreação e de abastecimento público do reservatório Itupararanga.** Dissertação – Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O aporte artificial de nutrientes nos ambientes aquáticos tem favorecido a incidência de florações de cianobactérias, causando impactos na qualidade da água e colocando em risco a saúde humana. O gênero de cianobactéria *Cylindrospermopsis*, amplamente distribuído em água doce pelo mundo, é capaz de produzir diversas cianotoxinas, dentre elas saxitoxina e análogos. O objetivo deste trabalho foi elaborar um modelo de exposição referente à ingestão de água contaminada por saxitoxina e análogos através da recreação de contato primário e do consumo de água. Os dados de densidade de células de *Cylindrospermopsis* e de concentrações de saxitoxina e análogos na água bruta foram obtidos da Rede de Monitoramento de Qualidade de Águas Superficiais da CETESB (2015 e 2016) do reservatório Itupararanga. O modelo conceitual de exposição e o cálculo da ingestão diária crônica de saxitoxina e análogos consideraram: concentrações máxima e mínima de saxitoxina e análogos encontradas na água bruta do reservatório, vias de exposição, população exposta, taxa de ingestão de água, frequência e duração da exposição, peso corporal para adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos), para cenários de exposição relativos à recreação de contato primário e consumo de água potável. Os valores de células de cianobactérias estiveram entre 2.216 e 203.082 céls.mL⁻¹ e as concentrações de saxitoxina e análogos estiveram entre 0,04 e 0,37 µg equivalente STX.L⁻¹. Os resultados obtidos na análise da água bruta do reservatório, estiveram abaixo do valor estabelecido na legislação brasileira para água potável (3 µg equivalente STX.L⁻¹), mas não atenderiam as especificações adotadas por Oregon e Ohio (0,3 µg equivalentes STX.L⁻¹) e à proposta em discussão no Comitê Permanente para Gestão Integrada da Qualidade da Água destinada ao Consumo Humano no Estado de São Paulo (0,13 µg equivalente STX.L⁻¹), indicando a possibilidade da ocorrência de efeito adverso à saúde em grupos sensíveis que utilizem água do reservatório, dependendo da eficiência de remoção dessas cianotoxinas no processo de tratamento. Os valores de ingestão diária crônica estimados, para recreação, variaram de 2,55 x 10⁻⁶ a 1,08 x 10⁻⁴ µg equivalente STX. kg⁻¹.dia⁻¹ (adultos) e 2,78 x 10⁻⁹ a 4,35 x 10⁻⁴ µg equivalente STX. kg⁻¹.dia⁻¹ (crianças). Para ingestão de água potável, esses valores variaram de 2,5 x 10⁻⁴ a 1,47 x 10⁻² µg equivalente STX. kg⁻¹.dia⁻¹ (adultos) e 5,36 x 10⁻⁵ a 2,55 x 10⁻² µg equivalente STX. kg⁻¹.dia⁻¹ (crianças). Esses valores indicaram que as crianças estão mais expostas que os adultos, fato preocupante, pois elas são mais sensíveis aos efeitos de substâncias tóxicas, e apesar de estudos indicarem efeitos da saxitoxina em cultura de células neurais, sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e de causar danos cognitivos em ratos, os efeitos da exposição crônica em humanos ainda são desconhecidos. Não foi possível estimar os riscos à saúde da população exposta à saxitoxina e análogos, pela falta de dados na literatura, porém o modelo de exposição proposto é um avanço para a identificação de lacunas para a condução da avaliação de risco à saúde humana considerando a exposição crônica.

Descritores: Cianobactérias, Saxitoxina, *Cylindrospermopsis* e Cenário de exposição.

ABSTRACT

MOSOLINO LERCHE, L. H. **Proposal of a model of human exposure to saxitoxin in recreational waters and public supply of the Itupararanga reservoir.** Dissertation – School of Public Health. University of São Paulo, São Paulo, 2018.

The artificial enrichment of nutrients in aquatic environments has favored the incidence of cyanobacteria blooms, causing impacts on water quality and putting human health at risk. The genus of cyanobacteria *Cylindrospermopsis*, widely distributed throughout the world in freshwater environments, is able to produce cyanotoxin, among them saxitoxin and its analogues. The objective of this work was to elaborate a model of exposure referring to the ingestion of water contaminated by saxitoxin and analogues through recreation of primary contact and water consumption. *Cylindrospermopsis* cell density and saxitoxin and analogues concentrations in surface water were obtained from the CETESB Surface Water Quality Monitoring Network for the Itupararanga reservoir in 2015 and 2016. The development of the conceptual model of exposure and the calculation of the chronic daily intake of saxitoxin and analogues, considered: maximum and minimum concentrations of saxitoxin and analogues found in the raw water of the reservoir, route of exposure, exposed population, rate of water intake, frequency and duration of exposure, body weight for adults (over 21 years) and children (under 5 years), for exposures scenarios concerning recreation of primary contact and consumption of drinking water. The values of cyanobacteria cells were between 2,216 and 203,082 cells.L⁻¹ and the concentrations of saxitoxin and analogues were between 0.04 and 0.37 µg STX equivalent. L⁻¹. The comparison of these variables indicated a significant positive correlation between them. The results obtained in the raw water analysis of the reservoir were below the value established in Brazilian legislation for drinking water (3 µg equivalent STX.L⁻¹), but would not meet the specifications adopted by US states Oregon and Ohio (0.3 µg equivalents.L⁻¹) and the proposed value for the Standing Committee for Integrated Water Quality Management for Human Consumption in the State of São Paulo (0,13 µg equivalent STX.L⁻¹), indicating the possibility of adverse health effects in sensitive groups using water from the reservoir. Estimated chronic daily intake values, for recreation, ranged from 2.55 x 10⁻⁶ to 1.08 x 10⁻⁴ µg STX equivalent. kg⁻¹.day⁻¹ (adults) and 2.78 x 10⁻⁹ to 4.35 x 10⁻⁴ µg STX equivalent. kg⁻¹.day⁻¹ (children). For water intake, these values ranged from 2.5 x 10⁻⁴ to 1.47 x 10⁻² µg STX equivalent. kg⁻¹ day⁻¹ (adults) and 5.36 x 10⁻⁵ to 2.55 x 10⁻² µg STX equivalent. kg⁻¹. day⁻¹ (children). These values indicated that children are more exposed than adults, a worrying fact because they are generally more sensitive to the effects of toxic substances than adults, and although studies indicate that saxitoxin was able to cross the blood brain barrier and to cause cognitive damage in rats, as well as changes in neural cell cultures, the effects of chronic exposure in humans are still unknown. It was not possible to estimate the health risks of the population exposed to saxitoxin and the like, due to the lack of data in the literature, but the proposed exposure model is an advance for the identification of gaps for conducting the human health risk assessment considering the exposure chronic.

Descriptors: Cyanobacteria, Saxitoxin, *Cylindrospermopsis* and Exposure scenario.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 <i>CYLINDROSPERMOPSIS</i>	21
3.2 CIANOTOXINAS	24
3.2.1 Lipopolissacarídeos de membrana (LPS)	24
3.2.2 Aminoácido não-protéico β -N-metilamino-L-alanina (BMAA)	25
3.2.3 Microcistina	27
3.2.4 Cilindrospermopsina	29
3.2.5 Saxitoxina e variantes	31
3.3 DIRETRIZES PARA ÁGUA TRATADA E ÁGUA DE RECREAÇÃO DE CONTATO PRIMÁRIO PARA SAXITOXINAS	38
3.3.1 Diretrizes para Água Tratada	40
3.3.2 Diretrizes para água de recreação	42
3.4 MÉTODOS PARA REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS DAS ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 ÁREA DE ESTUDO	48
4.2 AMOSTRAGEM E TRANSPORTE	53
4.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO	54
4.4 LEVANTAMENTO DOS DADOS	56

4.5 VARIÁVEIS DO MODELO CONCEITUAL DE EXPOSIÇÃO E CÁLCULO DA TAXA DE INGESTÃO	57
4.5.1 Concentração de cianotoxinas	57
4.5.2 Via de exposição	57
4.5.3 População exposta	58
4.5.4 Taxa de ingestão de água	58
4.5.5 Frequência e duração da exposição	59
4.5.6 Peso corporal	60
4.5.7 Equação da ingestão diária crônica	60
4.5.8 Cálculo da Ingestão diária crônica e tratamento de incertezas e variabilidade	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	77
7 REFERÊNCIAS	79

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELAS

Tabela 1 - Valores de LD ₅₀ de µg PSP. Kg ⁻¹ de peso corporal de ratos albinos, de acordo com as rotas de exposição.	36
Tabela 2 - Valores de LD ₅₀ de administração oral ou intraperitoneal em ratos de acordo com a idade.	37
Tabela 3- Densidades de células de cianobactérias (céls.mL ⁻¹) e de células de <i>Cylindrospermopsis</i> (céls.mL ⁻¹), porcentagem de células de <i>Cylindrospermopsis</i> em relação ao total de células e concentração de saxitoxina e análogos (µg. equivalente STX.L ⁻¹) no Reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016	62

QUADROS

Quadro 1 - Fatores Tóxicos Equivalente (TEF) para a saxitoxina e suas variantes.	37
Quadro 2 - Variáveis utilizadas para o cálculo do valor guia de saxitoxina para água tratada.	41
Quadro 3 - Valores de referência para cianotoxinas para água destinada ao abastecimento público de acordo com dois estados dos EUA, Austrália e Nova Zelândia.	42
Quadro 4 - Valores das variáveis utilizadas no cálculo dos valores guias para água recreacional e valores guias.	43
Quadro 5 - Processo de remoção de cianotoxinas e respectivas eficiências.	46
Quadro 6 - Municípios que utilizam água do reservatório Itupararanga para abastecimento, empresas fornecedoras de água potável, locais de captação e Referência de informações.	50
Quadro 7 – Porcentagem de reatividade da saxitoxina e variantes do kit ELISA da empresa ABRAXIS.	56
Quadro 8 - Parâmetros utilizados no cenário de exposição à água, taxa de ingestão, frequência de exposição, duração da exposição e peso corporal assumido para crianças e adultos.	68
Quadro 9 – Valores de Ingestão diária crônica de saxitoxina em µg. equivalente STX. kg ⁻¹ .dia ⁻¹ em relação à água potável e água de recreação de contato primário para crianças e adultos.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos de organismos da espécie <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> . Reservatório Itupararanga. 2017. Microscópio invertido Zeiss. Aumento de 400x.	22
Figura 2 - Estrutura básica da saxitoxina, grupos químicos variantes e peso molecular das saxitoxinas, goniatoxinas e C toxinas.	32
Figura 3 - Imagem aérea do reservatório Itupararanga com demarcação.	48
Figura 4 - Fotos da barragem do reservatório Itupararanga.	49
Figura 5 - Localização do reservatório Clemente.	50
Figura 6 - Imagem aérea do local de captação de água de Mairinque, no reservatório Fiscal.	51
Figura 7 - Localização do reservatório Itupararanga na UGRHI 10 – Sorocaba e Médio Tietê e do ponto de coleta de onde foram utilizados os dados. SOIT 02900.	53
Figura 8 - Foto de microplaca com amostras sensibilizadas com anticorpo específico para saxitoxina.	56
Figura 9 - Comparação entre as concentrações de células de <i>Cylindrospermopsis</i> (céls.mL ⁻¹), total de células de cianobactérias (céls.mL ⁻¹) e concentração de saxitoxina (µg. µg. equivalente STX.L ⁻¹) no reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016.	62
Figura 10 - Comparação entre as concentrações de células de cianobactérias totais (céls.mL ⁻¹), e concentração de saxitoxina (µg. equivalente STX.L ⁻¹) no reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016.	63
Figura 11- Dispersão entre as concentrações de células de <i>Cylindrospermopsis</i> (céls.mL ⁻¹), e concentração de saxitoxina (µg. equivalente STX.L ⁻¹) no reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016.	64
Figura 12 - Modelo conceitual de exposição à saxitoxina no reservatório Itupararanga, referente às elevadas densidades de células de cianobactérias do gênero <i>Cylindrospermopsis</i> , considerando as exposições referentes à ingestão de água potável e ingestão acidental de água durante atividade de recreação de contato primário.	69

Figura 13- Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg . 70
equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água destinada ao consumo humano para adultos.

Figura 14 - Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg . 70
equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água destinada ao consumo humano para
crianças.

Figura 15 - Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg . 71
equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água ingerida durante atividade de recreação de
contato primário para adultos.

Figura 16 - Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg . 72
equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água ingerida durante atividade de recreação de
contato primário para crianças.

Figura 17 - Análise de sensibilidade do cálculo da ingestão diária crônica (IDC) 74
relativa à ingestão água potável, para crianças e adultos.

Figura 18 - Análise de sensibilidade do cálculo da ingestão diária crônica (IDC) 75
relativa à ingestão acidental de água durante atividade de recreação de contato
primário, para crianças e adultos.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APA	Área de Proteção Ambiental
AR	Avaliação de Risco
ARfD	Acute Reference Dose = Dose de referência aguda
BMAA	Aminoácido não-protéico β -N-metilamino-L-alanina
CAG	Carvão Ativado granular
CAP	Carvão Ativado em pó
céls.	células
CDI	Chronic Daily Intake = Ingestão Diária Crônica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRF	Contribuição Relativa da Fonte
conc.	Concentração
EFSA	Agência Europeia de Segurança Alimentar = European Food Safety Authority
ELISA	Ensaio Imunoenzimático = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA.OEHHA	Environmental Protection Agency. Office of Environmental Health Hazard Assessment = Agência de Proteção Ambiental. Escritório de Avaliação de Perigo para a Saúde Ambiental
ETA	Estação de Tratamento de Água
GCS	Glutamilcisteína sintetase
HA	Health Advisory = Avisos de Saúde
HQ	Coeficiente de perigo = Hazard Quotient
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência = High Performance Liquid Chromatography
IDA	Ingestão Diária de Água
IDC	Ingestão Diária Crônica
IDR	Instituto de Doenças Renais
LD	Dose letal = Lethal Dose
LOAEL	Nível de efeito adverso mais baixo observado = Lowest Observed Adverse Effect Level
MU	Mouse Unit = Unidade de Camundongo
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level = Nenhum nível de efeito adverso observado
NRMMC	Natural Resource Management Ministerial Council = Conselho Ministerial de Gestão de Recursos Naturais
NHMRC	National Health and Medical Research Council = Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica
OHA	Autoridade de Saúde do Oregon = Oregon Health Authority
OMS	Organização Mundial de Saúde
org.	organismos
PC	Peso corporal
pH	Potencial Hidrogeniônico

PSP	Paralytic Shellfish Poisoning = Envenenamento Paralítico por Marisco
PST	Paralytic Shellfish Toxin = Toxina Paralítica de Mariscos
SAAE	Sistema Autônomo de Água e Esgoto
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SMA/SSRH	Secretaria do Meio Ambiente/ Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos
TDI	Tolerable Daily Intake = Ingestão Diária Tolerável
TEF	Toxic Equivalent Factor = Fator Tóxico Equivalente
RfD	Reference Dose = Dose de Referência
UF	Uncertainty factor = Fator de Incerteza
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
USDA	United States Department of Agriculture = Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
U.S.EPA	United States Environmental Protection Agency = Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WHO	World Health Organization = Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Toxina C = C toxin
CYN	Cilindrospermopsina
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DNA	Deoxyribonucleic acid
7-deoxy-CYN	7-deoxycilindrospermopsina
7-epi-CYN	7-epicilindrospermopsina
GTX	Goniautoxinas
Kb	kilobase
Light	São Paulo Electric Company
LPS	Lipopolissacarídeo
LWTX	Toxina de <i>Lyngbya wollei</i> = Lyngbya-wollei-toxins
MCYST-LR	Microcistina-LR
MC-LR	Microcistina-LR
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro (10^{-3} L)
mg	Miligrama (10^{-3} grama)
neoSTX	neosaxitoxina
pg	Picograma (10^{-12} grama)
RNA	Ribonucleic acid
STX	Saxitoxina
STX-eq	Saxitoxina equivalente
μL	Microlitro (10^{-6} Litro)
μM	Micromol (10^{-6} Mol)

1 INTRODUÇÃO

O enriquecimento artificial dos ambientes aquáticos provocado principalmente pela descarga de esgoto doméstico e industrial além das atividades agropastoris tem favorecido a incidência de florações de cianobactérias (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Essas florações estão se tornando cada vez mais frequentes, (HELLER; PÁDUA, 2006) e podem se configurar em riscos para a saúde humana, devido à capacidade desses organismos de produzirem toxinas (CARVALHO et al., 2013).

Aliado a isso, estudos demonstram que o aquecimento global poderá acentuar a ocorrência, a frequência e a duração de florações em razão do aumento da temperatura média das águas, provocando a estratificação térmica por períodos mais longos e desse modo promovendo condições propícias para o desenvolvimento das cianobactérias (MOLICA; AZEVEDO, 2009; BONILLA et al., 2012; PAERL; VALERIE, 2012; PIERANGELINI et al., 2015).

Além do comprometimento dos usos múltiplos dos corpos d'água superficiais, as florações de cianobactérias e de outros grupos da comunidade fitoplanctônica também podem contribuir para a iniquidade de um dos direitos constitucionais básicos de todo o cidadão, que é o acesso universal à água potável de qualidade, uma vez que interferem na eficiência e geralmente causam um aumento no custo do tratamento da água para abastecimento humano. Desse modo, também dificultando a implantação de um dos 17 Objetivos da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, que foi lançada em setembro de 2015 durante a Cúpula das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento Sustentável, especificamente o objetivo 6.1, que propõe alcançar o acesso universal e equitativo a água potável e segura para todos até 2030 (ONUBR, 2015).

Existem vários gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações e são citados na literatura como potenciais produtores de toxinas, denominadas cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999; HILBORN; BEASLEY, 2015). Dentre esses organismos, destaca-se a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, uma vez que é considerada invasora em ambientes temperados e tem se verificado aumento de registros de sua presença em águas doces globalmente (PADISÁK, 1997; SINHA et al., 2012).

É importante destacar a complexidade da situação, uma vez que esse aumento de registro pode estar associado tanto à melhoria do monitoramento da qualidade da água quanto ao aumento das condições propícias para seu desenvolvimento (KLING, 2009).

Outros fatores importantes a serem considerados são a variedade de mecanismos adaptativos da espécie *C. raciborskii*, que lhe confere vantagens competitivas sobre outros organismos do fitoplâncton, favorecendo sua dominância na comunidade (SINHA et al., 2012), e o alerta sobre essa espécie ser considerada uma das cianobactérias mais importantes em termos de acidentes por intoxicação no mundo (MCGREGOR; FABBRO, 2000).

A referida espécie pertence ao gênero *Cylindrospermopsis*, importante do ponto de vista de saúde humana devido à capacidade dos organismos compreendidos nessa classificação serem potencialmente produtores de metabólitos secundários como a cianotoxina neurotóxica, saxitoxina (STX) (WIESE et al., 2010).

Para minimizar e/ou reduzir a exposição às cianotoxinas, diversos países adotaram valores guias para quantidade de células de cianobactérias e concentração de cianotoxinas na água para consumo humano e em corpos de água usados para recreação e água potável (CHORUS, 2012), sendo que o Brasil foi o primeiro país a ter uma legislação específica para controle de cianobactéria e cianotoxinas em água potável (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014). Esse pioneirismo foi resultado do incidente ocorrido em 1996, no município de Caruaru, situado em Pernambuco. Na ocasião, 131 pacientes renais crônicos foram expostos às cianotoxinas e 76 foram a óbito (MOLICA et al., 2002).

No Brasil, as legislações que tratam do assunto são a Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 274, de 29 de novembro de 2000, a Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005, a Portaria de Consolidação nº 5, de 3 de outubro de 2017 e no Estado de São Paulo, a Resolução Conjunta SMA/SSRH Nº 4 de 22 de novembro de 2012.

A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 274, de 29 de novembro de 2000, “*Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras*”, determinando no Art. 2º, § 4º que as águas são consideradas impróprias quando for verificada “floração de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana”. Cabe ressaltar que essa legislação não apresenta valores guias relacionados à contagem de células de cianobactérias ou concentrações de cianotoxinas (BRASIL, 2000).

A Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005, “*Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*”, estabelecendo no Art. 4º as classificações para água doce de acordo com seus usos preponderantes e no Art. 14, suas condições e padrões determinando que águas doce de classe 1 deverão apresentar,

contagem de células de cianobactérias inferior a 20.000 céls.mL⁻¹, de classe 2, inferior a 50.000 céls.mL⁻¹ e de classe 3, inferior a 100.000 céls.mL⁻¹ (BRASIL, 2005).

A Portaria de Consolidação nº 5, de 3 de outubro de 2017, apresenta a “*Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde*” e que contém no anexo XX, o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Esse anexo incorpora na íntegra a Portaria do Ministério da Saúde nº 2914 de 12 de dezembro de 2011, que determina no Art. 40º, § 4º que quando a densidade de cianobactérias exceder 20.000 céls.mL⁻¹ deve-se realizar análise de cianotoxinas na água do manancial, no ponto de captação, com frequência semanal. Quanto às cianotoxinas, o valor máximo de microcistina na água destinada ao consumo humano não deve ultrapassar 1 µg.L⁻¹, já para equivalente de saxitoxina o valor não deve ultrapassar 3 µg.L⁻¹. Quando for detectada a presença de gêneros produtores de cilindrospermopsina e anatoxina-a(s), recomenda-se a análise dessas cianotoxinas na água atentando-se ao valor máximo aceitável de 1 µg.L⁻¹ para cilindrospermopsina. Para anatoxina-a(s) não foi recomendado um valor aceitável (BRASIL, 2017).

A Resolução Conjunta SMA/SSRH Nº 4 de 22/11/2012, “*Dispõe sobre a regulamentação das excepcionalidades para aplicação de algicidas nos corpos d’água superficiais no Estado de São Paulo e dá outras providências*”. Essa Resolução foi elaborada para atender uma demanda do Estado, que apresenta corpos hídricos destinados ao abastecimento que são vulneráveis a florações, eventualmente controladas com algicidas. Assim, o disposto nessa Resolução visa, dentre outros objetivos, diminuir a possibilidade de efeitos nocivos das cianotoxinas, tanto para biota quanto para a saúde humana, uma vez que o sistema convencional de tratamento de água não remove de maneira eficiente esse tipo de composto. (DURIGAN et al., 2012).

Diante dos desafios relacionados à manutenção e melhoria da qualidade das águas, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), instituiu em 1974 um programa de monitoramento da qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo, inicialmente com 47 pontos, a fim de subsidiar as ações de políticas públicas e assegurar os menores prejuízos possíveis à saúde humana e à biota aquática.

Em 2017, foram amostrados 461 pontos pela CETESB, sendo que em 64 pontos foram levantados dados relativos à comunidade fitoplanctônica e contagem de células de

cianobactérias. Desses pontos, 24 estão situados em rios e 40 em reservatórios, sendo 31 em locais onde ocorre captação de água para abastecimento público.

Dentre os pontos com monitoramento do fitoplâncton foram verificados alguns onde há ocorrência e mesmo dominância do gênero *Cylindrospermopsis*, como por exemplo no braço Rio Pequeno do reservatório Billings, no reservatório Broa e no reservatório Itupararanga. Desses, o reservatório Itupararanga se destaca por apresentar altas densidades de células de cianobactérias, dominância do referido gênero, por ser utilizado para as atividades de recreação de contato primário e para captação de água para abastecimento público e por ter um histórico de dados relevante na CETESB.

O reservatório Itupararanga, situado na bacia do Alto Sorocaba e Médio Tietê, fez parte de um estudo desenvolvido pela CETESB no período de 1997 e 1998 de “Atualização e Aperfeiçoamento de Metodologias Analíticas”, cuja atividade foi o desenvolvimento de índices biológicos para monitoramento de reservatórios, e teve como objetivo principal estabelecer métodos e medidas de biomonitoramento de reservatórios do Estado de São Paulo. Nessa ocasião, esse corpo d’água já suscitou preocupação devido à dominância de cianobactérias sobre os demais grupos da comunidade fitoplanctônica. Apesar de ter sido quantificado o gênero *Cylindrospermopsis*, o reservatório era dominado principalmente por organismos da ordem Chroococcales. O monitoramento desse reservatório na rede da CETESB iniciou em 2002, sendo que, a partir de 2008, observou-se incremento das densidades celulares de cianobactérias e dominância do gênero *Cylindrospermopsis*. A dominância de cianobactérias desse gênero, que até essa data havia sido intermitente, passou a ser constante. Esse cenário foi crucial para a escolha desse corpo d’água no desenvolvimento do presente trabalho.

A imbricação dos fatos relatados, aliada a crises no abastecimento de água, provocadas por períodos prolongados de seca e pelo aumento da demanda em função do crescimento das cidades, deverá intensificar o interesse no desenvolvimento de cenários de exposição a cianotoxinas, que já vem sendo demonstrado por alguns autores e agências ambientais (CHORUS; BARTRAM, 1999; CODD et al., 2005; WHO, 2008; OEHHA, 2009; CHURRO et al., 2012; NHMRC, NRMCC, 2016).

Desse modo, a identificação dos perigos relacionados à presença de cianobactérias e cianotoxinas em um corpo d’água e a elaboração de modelos de exposição, poderão nortear os estudos de avaliação de riscos (AR), ferramentas importantes no subsídio de processos

decisórios (FREITAS, 2002), principalmente em situações que demandam uma priorização de ações de políticas públicas como, por exemplo, no planejamento de planos de contingências para reservatórios que são utilizados em abastecimento público.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor um modelo conceitual de exposição humana à saxitoxina e seus análogos para o reservatório Itupararanga, em função das elevadas densidades de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis* nele detectados, considerando a ingestão de água durante atividades de recreação de contato primário e ingestão de água potável.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Apresentar a situação da qualidade da água do reservatório Itupararanga em termos de densidades de células de cianobactérias, porcentagem de células de *Cylindrospermopsis* em relação ao total de células de cianobactérias e as concentrações de saxitoxina encontradas no reservatório Itupararanga, com base nos dados do “Programa de avaliação da qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo, operação e manutenção das redes de monitoramento da CETESB”.
2. Construir um cenário de exposição à saxitoxina e análogos nesse reservatório, considerando a ingestão de água durante atividades de recreação de contato primário e ingestão de água potável, para nortear a construção do modelo conceitual de exposição para futuros estudos de avaliação de risco.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *CYLINDROSPERMOPSIS*

O gênero *Cylindrospermopsis* pertence à ordem Nostocales, família Aphanizomenonaceae (KOMÁREK et al., 2014). Apresenta dez espécies descritas com base em suas características morfológicas (BUCH, 2009). O gênero é caracterizado por tricomas com células cilíndricas ou em forma de barril e com presença facultativa de aerótopos (KOMÁREK, 2013). Os tricomas são solitários, frequentemente atenuados numa ou em ambas as extremidades, podendo ser retos, ligeiramente curvados, sigmoidalmente ondulados ou enrolados. Os heterocitos¹ se desenvolvem na posição terminal dos tricomas e os acinetos² são intercalares, sendo a posição e tamanho do acineto e as dimensões do heterocito, ferramentas importantes na identificação em nível de espécie (MOORE et al., 2004).

A classificação de cianobactérias, segundo Komárek et al. (2014), levou em consideração não apenas características morfológicas, mas também a posição dos tilacóides, análises filogenéticas baseadas em dados de sequências moleculares, extraídos a partir do genoma referente à transcrição de 31 proteínas conservadas, e imagens de microscopia eletrônica. No caso do gênero *Cylindrospermopsis*, a classificação considerou na filogenia molecular, sequência do gene 16S rRNA (KOMÁREK, et al., 2014).

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* apresenta extrema variação de suas características morfológicas tanto no ambiente quanto em culturas de laboratório, o que levou a necessidade de se realizar testes de similaridade, utilizando-se para isso a sequência gênica 16S do rRNA de tricomas com formas retas e espiraladas. Os resultados apontaram 99,8% de semelhança. Possivelmente essa plasticidade morfológica reflita a variação natural da população, porém, também é possível que represente uma morfogênese ambiental induzida temporariamente sob condições subótimas de crescimento ou reflita níveis de diferenciação de acordo com seu estágio no ciclo de vida (SAKER, et al., 1999). No reservatório Itupararanga, as células formam tricomas retos (Figura 1).

¹ Heterocito - estrutura responsável pela fixação de nitrogênio atmosférico.

² Acinetos - célula diferenciada que se forma quando as condições ambientais não estão favoráveis à sobrevivência do organismo

Figura 1- Fotos de organismos da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*. Reservatório Itupararanga. 2017. Microscópio invertido Zeiss. Aumento de 400x



Legenda: 1: Heterócito terminal; 2: Célula; 3: Tricoma
Fonte: Luciana Haipek Mosolino Lerche. 2017

A espécie *C. raciborskii* foi descrita pela primeira vez por Woloszynska (1912), em Java, Indonésia, a partir de amostras planctônicas coletadas de lagos entre os anos 1899 a 1900, sendo identificada como *Anabaena raciborskii*, (BUCH, 2009). No Brasil, o primeiro relato de sua ocorrência foi realizado por Palmer (1969) no Lago Paranoá em Brasília, sendo identificado na época como *Aphanizomenon flos-aquae*. (TUCCI; SANTANA, 2003). Atualmente sua ocorrência geográfica abrange Austrália, América do Sul, do Norte e Central (Cuba), África, países da Europa como Portugal, Alemanha, Hungria, Itália, Grécia e Sérvia, tendo sido detectado também no Japão (SINHA et al., 2012).

Seu crescimento, em geral, é favorecido quando a temperatura das águas superficiais está acima de 25°C e quando a coluna d'água apresenta estratificação térmica (McGREGOR ;FABBRO, 2000). Saker e Griffiths (2000), comprovaram isso em experimentos. Suas cepas tiveram taxa máxima de crescimento entre 25 e 30°C.

Essa espécie apresenta vários mecanismos de adaptação que lhe conferem vantagens competitivas sobre outras espécies do fitoplâncton, como formação de acineto, tolerância à baixa disponibilidade de nutrientes como fósforo e nitrogênio graças a capacidade de estocar fósforo e de fixar nitrogênio atmosférico (SINHA et al., 2012), tolerância a alterações ambientais de temperatura, pH, luz, condutividade e alcalinidade (CARNEIRO et al., 2013), boa resistência ao transporte e existência de ecotipos com diferentes tolerâncias e preferências ambientais (BONILLA et al., 2012). Também demonstrou interferir negativamente no

crescimento de cianobactérias do gênero *Microcystis*, conforme experimentos realizados por Mello et al. (2012).

Além disso, o gênero apresentou flexibilidade fisiológica, com capacidade de otimizar seu crescimento ajustando a captação de fosfato durante as flutuações das condições nutricionais do ambiente, o que ajudaria a explicar seu sucesso em uma ampla variedade de ecossistemas aquáticos (AMARAL et al., 2014). Também apresentou resistência à predação e boa flutuabilidade, que permite sua migração diurna na coluna de água, da zona eufótica para as camadas mais profundas, de modo que consegue acessar regiões mais ricas em nutrientes e minimizar os possíveis prejuízos fisiológicos em decorrência de seu acúmulo na superfície (PADISÁK, 1997).

Outra característica interessante desses organismos, e que deve ser levada em consideração, é que mesmo em elevadas concentrações não há alteração da coloração da água, como geralmente ocorre em florações de outros gêneros, uma vez que apresenta baixa concentração de clorofila *a*. Essa variável, portanto, subestima a densidade de *Cylindrospermopsis* no ambiente, dificultando a constatação de florações (McGREGOR; FABBRO, 2000).

Os riscos à saúde humana atribuídos a esse organismo são referentes à presença de lipopolissacarídeos (LPS) em suas membranas, características comum à todas cianobactérias, capazes de causar irritação e alergias ao contato primário e a sua capacidade de produzir o aminoácido não-protéico β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), a cilindrospermopsina (CYN) e a saxitoxina (STX) e análogos (CHORUS; BARTRAM, 1999; CARVALHO et al., 2013). Além dessas cianotoxinas, há indícios de que esse organismo também seja capaz de produzir microcistina (MANTHOS et al., 2016).

A função das cianotoxinas não foi completamente elucidada, mas sua produção pode estar relacionada à proteção contra predação e ser um mecanismo de defesa contra exposição química (RZYMSKI; PONIEDZIAŁEK, 2014), sendo influenciada também por fatores como intensidade de luz e tempo de exposição, temperatura, salinidade e movimento da água, competição por recursos e fase de crescimento (MEREL et al., 2013).

A variação das linhagens potencialmente tóxicas está possivelmente ligada a sua distribuição geográfica, uma vez que linhagens australianas e tailandesas caracterizaram-se por produzirem cilindrospermopsina, cepas brasileiras apresentaram a capacidade de produzir saxitoxina (LAGOS, 1999, BERNARD et al. 2003; ZAJAC, 2006) e cilindrospermopsina (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011), enquanto em linhagens francesas, portuguesas e

alemãs foi encontrado outro metabólito tóxico ainda não identificado, mas com características semelhantes a cilindropermopsina (BERNARD et al., 2003; FALCONER, 2005).

3.2 CIANOTOXINAS

As cianotoxinas que podem ser potencialmente produzidas por organismos do gênero *Cylindropermopsis* serão abordadas a seguir separadamente, em função de suas importâncias, da contextualização de cada uma e de suas singularidades. No entanto, devido à ausência de informações específicas, algumas dessas cianotoxinas não serão utilizadas no contexto desse trabalho. A cianotoxina que será utilizada no cenário de exposição é a saxitoxina.

3.2.1 Lipopolissacarídeos de membrana (LPS)

Os lipopolissacarídeos, também conhecidos como endotoxinas, são estruturas da parede celular típicas de bactérias gram-negativas, sendo encontrados também em paredes celulares de cianobactérias. Essas estruturas apresentam uma porção polissacarídica e uma porção lipídica, permanecendo ancoradas na membrana externa da parede celular. Elas possuem atividade imunoestimuladora e são essenciais para a sobrevivência das bactérias por contribuírem para a estabilidade e integridade da membrana (GEMMA et al., 2016).

Em 2009, foi publicada a primeira estrutura de LPS de uma cianobactéria, sendo utilizado nesse estudo cepas de *Synechococcus*. Apesar de não haver um consenso sobre uma estrutura geral de LPS para todas as cianobactérias, foi a partir desse estudo que foi possível verificar que há diferenças importantes na estrutura química dos polissacarídeos presentes em membrana de cianobactérias e de bactérias gram-negativas (GEMMA et al., 2016).

A revisão realizada por Stewart et al. (2006a) sugeriu que os riscos relacionados à exposição ao LPS provenientes de cianobactérias são controversos, podendo apresentar efeitos biológicos diferentes. Sua atividade endotóxica varia de acordo com sua conformação tridimensional e seus agregados multimétricos. Durai *et al.* (2015) discutiram, dentre outros fatores, os possíveis efeitos do LPS em humanos, relatando que apesar deles serem considerados toxinas irritantes devido as suas propriedades dermatotóxicas e inflamatórias,

em cianobactérias, esses lipopolissacarídeos são até 10 vezes menos tóxicos que os presentes nas bactérias Gram-negativas.

Um estudo realizado por Macagno et al. (2006) demonstrou que o LPS extraído de uma cianobactéria filamentosa de água doce, além de não induzir a produção de citocina³ também apresentou um efeito antagônico ao LPS extraído de *Escherichia coli* em células humanas. Uma revisão sobre o tema, realizada por Gemma et al. (2016), conclui que, apesar de LPS de cianobactérias não incitar reações imunes fortes e de existir LPS que apresente um efeito protetor contra reações inflamatórias induzidas por bactérias, há a necessidade de mais estudos sobre o LPS derivado de cianobactérias. O “The Guidelines for Managing Risks in Recreational Water”, publicado em 2008 considera os riscos de exposição recreacional aos LPSs de cianobactérias, o menor dos perigos relacionados a esses organismos.

Desse modo, apesar de sua importância em relação a exposição de recreação de contato primário pela possibilidade de causar irritações dérmicas e da importância em relação a ingestão de água, devido a possibilidade da ocorrência de processos inflamatórios no trato digestório, essa cianotoxina não será considerada neste trabalho em virtude da inespecificidade dos sintomas de intoxicação subagudas dificultarem o diagnóstico (GIANNUZZI et al., 2011), e desse modo subestimarem sua ocorrência e estudos epidemiológicos.

Além disso também foram consideradas no impedimento de sua utilização a possibilidade de ser encontrada em bactérias gram-negativas, amplamente distribuídas no meio ambiente, o fato dos efeitos à saúde humana provocados por LPSs encontrados em cianobactérias ainda serem controversos e de não ter sido encontrado trabalho específico sobre LPS de *Cylindrospermopsis*.

3.2.2 Aminoácido não-protéico β -N-metilamino-L-alanina (BMAA)

O aminoácido não-protéico β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) é uma neurotoxina associada com a possível causa de enfermidades neurodegenerativas, como esclerose amiotrófica lateral, mal de Parkinson e doença de Alzheimer (COX et al., 2003).

³ Citocina-mensageiros químicos responsáveis pela regulação do sistema imune.

Essa substância foi isolada originalmente de uma árvore do gênero *Cycas* em 1967, em uma ilha situada na porção ocidental do Oceano Pacífico, a ilha de Guam. Nessa ilha, havia uma elevada incidência de doenças relacionadas à esclerose amiotrófica lateral/Complexo de demência Parksoniana, e esse fato foi relacionado ao consumo de *Cycas* e de morcegos, que também se alimentavam dos frutos das *Cycas*, pelos indígenas da tribo Chamorro (COX et al., 2003, ROSÉN; HELLENÄS, 2008, FAASSEN, 2014).

Com o aprimoramento das investigações, verificaram o crescimento simbiótico de cianobactérias na raiz da referida árvore e descobriu-se que era a cianobactéria o organismo responsável pela produção do BMAA (COX et al., 2003). Atualmente, também foi demonstrada a produção de BMAA por organismos marinhos como diatomáceas planctônicas e dinoflagelados. (FAASSEN, 2014).

O BMAA pode estar presente de forma livre no meio ambiente aquático ou associado a proteínas endógenas de animais que tiveram contato com essa toxina. Quando esse aminoácido está agregado a proteínas endógenas, funciona como reservatório e pode ser passado através de níveis tróficos superiores de uma cadeia alimentar, aumentando sua concentração nos organismos receptores a medida que avança na cadeia. Fato comprovado com a constatação das concentrações de BMAA encontradas nos tecidos dos morcegos, que foram 10.000 vezes maiores do que as produzidas pelas cianobactérias das raízes das *Cycas*. (COX et al., 2003, JIANG et al., 2014).

Um aspecto importante da ação dessa toxina é o seu longo período de latência, uma vez que mesmo após anos e até décadas da saída de pessoas de Guam, a incidência da doença nessas pessoas é quatro vezes maior do que no restante da população mundial. Esse conceito de neurotoxina de ação lenta não tem precedente, não sendo conhecida nenhuma neurotoxina que apresenta início significativamente tardio no desenvolvimento dos sintomas após a exposição. A possível explicação para esse período de latência seria a possibilidade do BMAA estar conjugado às proteínas do corpo humano e ser liberado lentamente para os tecidos durante o metabolismo proteico (MURCH et al., 2004).

De acordo com Faassen (2014), que fez uma revisão e discussão de artigos importantes relacionados a detecção de BMAA em sistemas aquáticos, as concentrações de BMAA reportadas nesses sistemas variaram amplamente entre os estudos, devido principalmente à diversidade de métodos utilizados, os quais também apresentavam diferenças nos limites de detecção e quantificação, impedindo desse modo a comparação de resultados. Também foi

mencionada a impossibilidade de avaliação de estudos passados quanto à confiabilidade dos dados obtidos e a existência do isômero 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB), que se não for distinguido durante a análise provocará alteração nos resultados.

O problema de detecção do BMAA também foi relatado no estudo de Rosén e Hellenäs (2008), que desenvolveram um método usando cromatografia líquida acoplada a espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS) para detecção da referida substância de maneira direta, desse modo, minimizando o aparecimento de compostos semelhantes ao BMAA durante o processo de derivação que poderiam elevar a detecção do produto nas amostras e superestimar o resultado. Foram avaliadas amostras de *Cycas* e de cianobactérias do gênero *Spirulina* de duas fontes diferentes, de uma floração que ocorreu no mar Báltico e de cepas comerciais. Os resultados para detecção de BMAA da *Cycas* foi semelhante a outros estudos, mas nas amostras de cianobactérias não foi confirmada a presença do BMAA, o que contradiz o estudo de Cox et al. (2005), que teria encontrado uma concentração entre 3 a 6.000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em 95% das amostras de cianobactérias investigadas, indicando que possivelmente, em estudos anteriores, a concentração dessa substância foi superestimada.

Considerando as dificuldades relacionadas a quantificação dessa substância, bem como de comparação dos resultados, em função de terem sido empregados métodos diversos em sua detecção e quantificação, além da falta de estudos referentes a possível produção de BMAA pelo gênero *Cylindrospermopsis*, esta cianotoxina não foi considerada nesse trabalho.

3.2.3 Microcistina

A microcistina, heptapeptídeo cíclico (peptídeo formado por sete aminoácidos), foi isolada pela primeira vez por Bishop e colaboradores em 1959, da cianobactéria do gênero *Microcystis* (MOORE, 1996). Em 1988, em função dessa toxina ter sido denominada fator de morte, Carmichael e colaboradores, sugeriram que fosse adotada como nomenclatura oficial, “microcistina” (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Foram identificados aproximadamente 100 análogos dessa cianotoxina (U.S.EPA, 2015a), sendo que a variante mais frequentemente encontrada é caracterizada pela presença de leucina (L) e de arginina (R) nas posições 2 e 4 da estrutura, conhecida como MCYST-LR ou MC-LR (CHORUS; BARTRAM, 1999). Ela pode ser produzida por cianobactérias dos gêneros

Microcystis, *Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Fischerella*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Gloeotrichia* (U.S.EPA, 2015a).

A microcistina é a mais comumente encontrada pelo mundo, sendo relativamente estável no ambiente por ser resistente à hidrólise em pH próximo ao neutro. A exposição à essa substância proveniente de fontes de água potável contaminada pode ocorrer através contato de partes do corpo (cutânea) ou ingestão (oral) de água contaminada. Foram encontrados relatos de água tratada destinada ao abastecimento público com microcistina dissolvida em diversas partes do mundo como, por exemplo, nos Estados Unidos (U.S.EPA, 2015a) e no Egito (MOHAMED et al., 2015), sendo que em algumas ocasiões, a cianotoxina ultrapassou o valor de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ na água potável.

Em relação a atividades recreativas, essa exposição pode ocorrer por contato direto, inalação e/ou ingestão, sendo também encontrados relatos de pessoas expostas que sofreram intoxicações (U.S.EPA, 2015a).

O mecanismo de toxicidade dessa cianotoxina é complexo. Gehringer (2004) fez uma revisão sobre o tema e apontou o principal mecanismo de ação e seus desdobramentos. A microcistina é um potente inibidor das proteínas fosfatases Serina/Theorina (PP1 e PP2A), *in vitro* e *in vivo*, esse recurso permite que a molécula de microcistina interaja com uma ampla diversidade de moléculas intracelulares resultando em aumento dos processos de fosforilação das proteínas regulatórias das células.

Além disso, a inibição da proteína PP1 também pode provocar interferência em vários processos celulares uma vez que ela está associada à divisão celular, apoptose, reorganização do citoesqueleto e regulação dos receptores de membrana. Já a inibição da proteína PP2A pode afetar, dentre outras funções, a proliferação e morte celular, a dinâmica do citoesqueleto, o controle do ciclo celular e a regulação de diversas vias de sinalização (SHI, 2009).

Como consequência da exposição podem promover tumores, quando a exposição ocorre em baixas, mas contínuas, concentrações, e/ou promover o aumento de apoptose celular em vários órgãos, quando a exposição se dá em altas concentrações. Os efeitos no fígado, considerado o órgão alvo devido ao fato da citotoxicidade da microcistina ser mais acentuada nos hepatócitos (McDERMOTT et al., 1998), podem ser provenientes da apoptose de suas células, induzida pela cianotoxina, ou por hipóxia derivada da obstrução do fluxo sanguíneo

para os tecidos hepáticos em função da degeneração dos vasos sanguíneos do órgão (GEHRINGER, 2004).

Os indícios da produção dessa toxina pela espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foram demonstrados por Manthos et al. (2010), que testaram oito cepas de cianobactérias da ordem Nostocales provenientes de corpos d'água da Grécia, para produção de microcistina, cilindrospermopsina, anatoxina-a, saxitoxina e nodularina pelo método de cromatografia líquida com ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massa. O resultado foi positivo para presença de microcistina na cepa de *Cylindrospermopsis*.

Outro indício da produção de microcistina pelo referido gênero foi observado no estudo realizado por Otaño e Bogarín (2014), que também quantificaram microcistina em cultivos de *Cylindrospermopsis* provenientes de Arroyo Yatay, um afluente do rio Uruguai, utilizando o método ELISA. A referida cianotoxina só foi quantificada nos cultivos, em concentrações muito elevadas de células, acima de 5 milhões de células por mL.

Embora essa cianotoxina seja importante em relação às exposições de recreação de contato primário e ingestão de água potável, as evidências de produção dessa cianotoxina pelo gênero *Cylindrospermopsis* são escassas e desse modo, não foi contemplada nesse trabalho.

3.2.4 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina (CYN) é um alcalóide com uma porção guanidino funcional central combinado com hidroximetiluracilo ligado a um tricíclico esqueleto de carbono. Sua estrutura química foi proposta pela primeira vez em 1992, por Ohtani e colaboradores. Essa cianotoxina de peso molecular de 415 daltons, apresenta dois análogos, o 7-deoxicilindrospermopsina (7-deoxy-CYN) e o 7-epicilindrospermopsina (7-epi-CYN) (NORRIS, 1999) e pode ser produzida por cianobactérias dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Umezakia*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Hormocilla* (ZAJAC, 2006; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; RZYMSKI; PONIEDZIAŁEK, 2015.).

Existem diversos fatores que influenciam na concentração dessa toxina na água, como concentração do organismo produtor, forma de liberação pela célula, estabilidade e degradação, sendo que sua liberação na água pode ser realizada por transporte ativo em

células intactas sob condições de estresse fisiológico, não sendo necessária a lise das células para que essa toxina fique disponível no meio ambiente (PREUßEL et al., 2009).

A degradação da cilindrospermopsina em águas de superfície é um processo complexo, envolvendo muito fatores, como presença de oxigênio, uma vez que condições anóxicas não favorecem sua degradação (KLITZKE; FASTNER, 2012), presença de bactérias, que acelera a degradação biológica, e a presença de pigmentos de algas, que acelera a degradação fotoquímica da cilindrospermopsina. De modo geral, a meia vida dessa toxina na água pode variar de 11 a 15 dias até 8 semanas (CHISWELL et al., 1999).

Considerando que concentrações de CYN intra e extracelular dependem de múltiplos fatores ambientais, que ela pode se acumular na água ao longo do tempo e que sua produção não ocorre necessariamente sob condições ótimas de crescimento dos organismos produtores, não foi possível relacionar densidades celulares de cianobactérias e concentrações de CYN (RZYMSKI; PONIEDZIAŁEK, 2014).

O interesse por essa cianotoxina foi despertado em 1979, quando ocorreu o primeiro caso de intoxicação humana, na Austrália. Na ocasião 148 pessoas foram hospitalizadas por intoxicação (HAWKINS et al., 1985). No Brasil, os registros de sua ocorrência foram relatados no trabalho realizado por Azevedo et al. (2002), onde foram analisadas a resina e o carvão do sistema de tratamento de água de uma clínica de hemodiálise no município de Caruaru, Pernambuco e por Bittencourt-Oliveira et al. (2011), em um trabalho que envolveu três reservatórios no Nordeste.

Os efeitos clínicos da exposição à cilindrospermopsina são febre, cefaleia, vômitos, diarreia sanguinolenta, hepatomegalia e danos nos rins (U.S. EPA, 2015). Em relação aos efeitos dérmicos, estudos realizados por Stewart et al. (2006 b) e por Torokne et al. (2001) em ratos, demonstraram positiva reação alérgica, e foi considerada moderada por Torkne et al. (2001).

Os sintomas primários de sua ação são a falência renal e hepática, entretanto, também apresenta ação sobre o trato intestinal, sistemas vasculares e musculares, glândula adrenal, pulmões, além de promover efeitos genotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (HUMPAGE et al., 2000, BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014, U.S. EPA, 2015). Houve evidência de efeitos sobre as células vermelhas do sangue de ratos durante exame microscópico, revelando a presença de glóbulos vermelhos com superfícies alteradas em vez da sua forma normal bicôncava-disco. A remoção dessas células anormais pelo baço aumenta tanto o peso do baço

quanto a bilirrubina no soro, e estimula a hematopoiese (REISNER et al., 2004; U.S. EPA, 2015).

Estudos realizados por Chong et al. (2002), com hepatócitos de ratos indicaram que a cilindrospermopsina adentra nas células por duas maneiras: pelo sistema de transporte envolvendo ácidos biliares e por simples difusão passiva, uma vez que a molécula apresenta baixo peso molecular. A segunda via é mais importante que a primeira por permitir entrada contínua da CYN.

Um dos mecanismos de ação da CYN é o bloqueio irreversível da síntese de proteínas com diminuição da glutathiona (GSH) que protege as células contra o estresse oxidativo (RUNNEGAR et al., 1995). O outro mecanismo de ação envolve fragmentação do DNA e/ou perda de cromossomos inteiros durante a anáfase devido à má formação dos microtúbulos (HUMPAGE et al., 2000).

Apesar da importância em relação à saúde humana devido aos inúmeros problemas que podem ser desencadeados em função da exposição a essa cianotoxina, esta substância não foi considerada no estudo devido à inexistência de dados de monitoramento e de não ter sido constatada sua produção em trabalhos realizados com cepas do estado de São Paulo (ZAJAC, 2006; RISSETI, 2012; SCHAKER, 2012).

3.2.5 Saxitoxina e análogos

A saxitoxina (STX) pertence a um vasto grupo de alcalóides com propriedades neurotóxicas conhecidos como PSTs (paralytic shellfish toxin). As intoxicações severas e ocasionalmente fatais provocadas por toxinas do tipo PST são denominadas PSPs (paralytic shellfish poisoning) (WIESE, 2010).

As PSTs são moléculas tricíclicas compostas basicamente por uma tetrahidropurina e dois grupos guanidínicos (AMORIM, 2007; WIESE, 2010), podendo ser não sulfatadas (saxitoxinas - STX), mono sulfatadas (goniautoxinas - GTX) ou duplamente sulfatadas (toxinas C). Há também as decarbamoíls e suas variantes (CHORUS; BARTRAM, 1999). A referida molécula apresenta cinco grupos químicos (R1 à R5) que podem variar conforme representado na figura 2.

Figura 2 - Estrutura básica da saxitoxina e grupos químicos variantes dos análogos da saxitoxina

Toxina	Grupos químicos variáveis				
	R1	R2	R3	R4	R5
STX	H	H	H	CONH ₂	OH
neo STX	OH	H	H	CONH ₂	OH
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
dcSTX	H	H	H	H	OH
dcneoSTX	OH	H	H	H	OH
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
Zetekitoxina					
LWTX1	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	H
LWTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	OH
LWTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	COCH ₃	OH
LWTX4	H	H	H	H	H
LWTX5	H	H	H	COCH ₃	OH
LWTX6	H	H	H	COCH ₃	H

Legenda: STX - Saxitoxina; GTX - Gonialtoxina; C - toxina C; neoSTX - neo saxitoxina; dcSTX - decarbamoilsaxitoxina; LWTX - toxina de *Lyngbya wollei*.

Fonte: CHORUS e BARTRAM (1999), AMORIM (2007), SCARDALA et al. (2016), MEREL, et al. (2013) e Oshima⁴ (1995, apud Hallegraeff et al., 2004 p. 192).

De modo geral, são estáveis quimicamente e solúveis em água, podendo ser degradadas em condições alcalinas fortes. Em temperatura de 25°C, a meia vida para degradação de diferentes tipos de saxitoxina variou de 9 dias a mais de 3 meses (JONES; NEGRI, 1997). A saxitoxina (peso molecular de 299) é a variante mais estável em condições ácidas (pH de 3 a 4), podendo ser armazenada a 5 °C durante anos sem perder sua toxicidade (INDRACENA; GILL, 2000; WIESE, 2010).

Ao todo já foram descobertos 57 análogos das PSTs (WIESE, 2010), portanto, para fins de monitoramento, quando é utilizado a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detecção dessas substâncias, usa-se a expressão equivalente de STX (STX-eq) (BOTANA et al., 2010).

⁴ Oshima, Y. Post-column derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. 1995 In: HALLEGRAEF G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A. D. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO. (IOC manuals and Guides, 33), pp. 81-94.

As PSTs estão amplamente distribuídas pelo mundo e podem ser produzidas por alguns organismos marinhos como dinoflagelados dos gêneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*, e por cianobactérias planctônicas de águas doces dos gêneros *Cylindrospermopsis* (LAGOS et al., 1999), *Dolichospermum* (VELZEBOER et al., 2000), *Aphanizomenon* (BALLOT et al., 2010), *Planktothrix* (POMATI et al., 2000) e *Lyngbya* (ONODERA et al., 1997).

Esses compostos podem ser encontrados dentro das células dos organismos produtores, livremente na coluna d'água ou se acumular nos tecidos de invertebrados filtradores como mariscos, moluscos e crustáceos sem lhes causar dano aparente. Tal característica possibilita à esses filtradores servirem como vetor da toxina, transmitindo-a para níveis tróficos superiores (WIESE, 2010).

Essa toxina foi isolada pela primeira vez em 1957 por Schantz e colaboradores (MARTINELLI, 1986). Eles utilizaram o bivalve marinho *Saxidomus gigangteus*, encontrado na costa oeste dos EUA, onde também foram observados dinoflagelados que provocavam o fenômeno denominado “maré vermelha” (CHORUS; BARTRAM, 1999; WIESE, 2010). Entretanto, sua estrutura química só foi completamente elucidada em 1975, por dois grupos independentes (WIESE, 2010).

No Brasil, o primeiro registro da produção de PST por organismos da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi realizado por Lagos et al. (1999). Na ocasião, foram isoladas três cepas, uma delas proveniente de uma amostragem realizada em uma fazenda, situada no município de Amparo (SP), onde havia sido registrada uma ocorrência de floração de *Cylindrospermopsis* e duas cepas provenientes de amostras do reservatório Billings, coletadas para o programa de monitoramento da qualidade de águas interiores da CETESB e que, durante a realização de bioensaios com ratos, evidenciaram reações toxicológicas semelhantes às causadas por PSTs.

Sua biossíntese e regulação foram diretamente relacionados à presença do grupo de genes *stx*, uma vez que, sem os genes necessários para sua biossíntese, não há produção de toxina. (PEARSON et al., 2016).

Quanto à produção de saxitoxina, estudos em laboratório com cepas de *C. raciborskii* realizados por Stucken, et al. (2014) demonstraram que produção de saxitoxina foi dependente da fase de crescimento e afetada negativamente pela privação de nitrogênio. A transcrição dos

genes responsáveis pela expressão das toxinas diminuiu nas primeiras horas de privação de N, porém voltou a crescer com o passar do tempo devido à capacidade de fixação de nitrogênio dos organismos, porém, a níveis mais baixos do que sob condições favoráveis de nitrogênio no ambiente.

Além de sua ocorrência natural, as PSTs também podem ser biotransformadas em compostos que não podem ser produzidos diretamente por cianobactérias ou dinoflagelados, podendo ocorrer a conversão de uma PST menos tóxica para um análogo mais tóxico ou o contrário, conversão de uma mais tóxica para uma menos tóxica. Essas biotransformações podem ocorrer no interior de moluscos bivalves filtradores, por degradação bacteriana, através de processos de tratamento bioativos ou através do metabolismo celular (WIESE, 2010).

O primeiro relato de intoxicação por PST ocorreu no século XVIII. O capitão do veleiro “Discovery”, George Vancouver, apresentou sintomas característicos de PSP e foi a óbito após ter ingerido marisco quando navegava por uma área conhecida, atualmente, por British Columbia (MAGALHÃES, 2015).

O mecanismo de ação da saxitoxina e suas variantes baseia-se no bloqueio dos canais iônicos de sódio das membranas axonais das células nervosas, evitando a geração e propagação dos impulsos nervosos (KAO, et al., 1983) e bloqueando os canais de cálcio e potássio em células cardíacas, impedindo a propagação da ação muscular (SU et al., 2004).

A distribuição e excreção da saxitoxina e suas variantes em seres humanos foi demonstrada através de estudos realizados por Llewellyn et al. (2002) com fluidos corporais, conteúdo intestinal e tecidos obtidos post-mortem de uma vítima fatal de intoxicação por PST após ingestão de caranguejo. Os resultados da autópsia confirmaram que a distribuição da toxina pelo organismo é feita através da corrente sanguínea, tendo sido encontrada PST no fígado e em maior quantidade na urina, confirmando os resultados de outras pesquisas, como as de Gessner et al., 1997, que demonstraram que a principal via de excreção das PSTs ocorre pela urina. Nesse estudo também foi sugerido que a meia vida da toxina sérica é de menos de 10 horas, com base em observações de pessoas intoxicadas por consumo de marisco contaminado.

Os efeitos clínicos de intoxicação são variados e a maioria das informações foram provenientes da ingestão de mariscos contaminados: paralisias, asfixia, náusea, adormecimento da boca e extremidades, fraqueza muscular, dentre outros. Em caso de

intoxicação letal, quando o efeito é agudo, a morte pode ocorrer de 2 a 12 horas após a exposição, já em casos não fatais, a intoxicação pode ocorrer em um período de 1 a 6 dias após a exposição (GESSNER et al., 1997, FITZGERALD et al., 1999; HARDY, 2011; FARRER et al., 2015).

Efeitos crônicos como a possibilidade de causar danos genotóxicos, foram demonstrados por Costa et al., 2012, em ensaios realizados com o peixe marinho da espécie *Diplodus sargus*. Os testes consistiram de aplicações intraperitoneais de aproximadamente $1,60 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$, extraídas de culturas de células do dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, e posterior análise dos eritrócitos dos organismos sacrificados após 2 e 6 dias da exposição. O teste para frequência de anormalidade nuclear de eritrócito (ENA), realizado através de visualização das células coradas e ampliada 1.000 vezes, evidenciou aumento significativo de lesões nucleares (caracterizada pela formação de micronúcleos e de anormalidades nucleares como núcleos em forma de rim, lobados e segmentados) após os dois períodos de exposição, indicando atividade clatogênica/aneugênica. Também se observou que a frequência das anormalidades (ENA) foi mantida significativamente alta nos organismos expostos até o sexto dia, independentemente do fato de ter ocorrido diminuição dos níveis de dcSTX no fígado do dia 2 para o dia 6, e da hipótese de eliminação dos outros grupos de PSTs entre o segundo e o sexto dia.

Os efeitos teratogênicos foram visualizados em ensaios realizados com exposição de embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) a diferentes concentrações de saxitoxina purificada (10, 50, 100, e $500 \mu\text{g.L}^{-1}$). Os resultados demonstraram que a $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, 34% dos embriões tratados apresentaram malformações, sendo essas visíveis após 6 dias de desenvolvimento, levando a um aumento de aproximadamente 40% na mortalidade (OBEREMM et al., 1999).

Além dos efeitos citados acima, há os que ainda estão sendo explorados, como efeitos sobre o sistema nervoso central. O estudo conduzido por Diehl et al. (2016), sugere que a exposição prolongada à STX pode acarretar em efeitos amnésicos sobre a memória e diminuir o processo de aprendizagem. Nesse estudo, os ratos beberam água contaminada com *Cylindrospermopsis* por 30 dias. Essa água foi preparada de modo a apresentar concentrações de equivalente de STX nas proporções 3 e $9 \mu\text{g. L}^{-1}$, sendo que a ingestão de cada rato testado foi de 0,24 ou 0,72 μg de equivalente de STX por dia. Esses animais foram submetidos a diversos testes e os resultados demonstraram que não houve efeito motor ou ansiolítico, mas sim alterações cognitivas relacionadas à memória no grupo tratado com $9 \mu\text{g. L}^{-1}$. O grupo tratado com $3 \mu\text{g. L}^{-1}$ não apresentou alterações significativas.

Tais resultados podem ser corroborados pelos estudos realizados por Cervantes Cianca et al. (2007) em ratos macho administrados com injeções intraperitoneais de STX, nas proporções de 5 e 10 μg por kg de peso corpóreo, e sacrificados após 30, 60 e 120 minutos (para dose de 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de STX) e 30 minutos (para dose de 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de STX), que demonstraram que a STX é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo encontrada em todo o cérebro em pg/mg de tecido cerebral. Apesar de ter sido encontrada em todo o cérebro, sua distribuição foi heterogênea. De modo geral, os tecidos que tiveram maiores concentrações de STX foram o hipotálamo e córtex frontal.

Os estudos de toxicidade relativos a obtenção de valores da dose letal 50 (LD_{50} – Lethal Dose), que é a dose que provoca a morte de 50% dos animais testados após um período de observação, variaram conforme a forma de administração e a idade dos animais testados.

Estudos realizados por Wiberg e Stephenson (1960), com camundongos albinos demonstraram que os valores de LD_{50} variaram de acordo com as rotas de exposição (tabela 1). Eles concluíram que a taxa de absorção interfere na toxicidade e a rota oral apresentou-se menos tóxica devido a incompleta ou tardia absorção pelo intestino.

Tabela 1 - Valores de LD_{50} de μg PSP. kg^{-1} de peso corporal de camundongos albinos, de acordo com as rotas de exposição

Via de exposição	LD_{50} de μg PSP. kg^{-1} de peso corporal
Intravenoso	3,4 (3,2 - 3,6)
Intraperitoneal	10 (9,7 - 10,5)
Oral	263 (251 - 267)

Fonte: Adaptado de WIBERG; STEPHENSON (1960)

Já os estudos realizados por Watts et al. (1996) obtiveram o LD_{50} para ratos em diferentes idades, sendo eles recém-nascidos com 24 horas de vida, desmamados com 21 dias e jovens e adultos com 60 a 70 dias de vida (tabela 2). Os dados mostram maior efeito tóxico em recém-nascidos devido, provavelmente, a maior taxa de absorção nesses animais e ao menor desenvolvimento do estômago quando comparado com animais mais velhos.

Tabela 2 - Valores de LD₅₀ de µg PSP. kg⁻¹ de peso corporal de administração oral ou intraperitoneal em ratos de acordo com a idade

Idade	LD ₅₀ (µg PSP. kg ⁻¹ de peso corporal)	
	Oral	Intraperitoneal
Recém-nascidos (24 horas)	64 (51 - 80)	5,5 (4,7 - 6,5)
Em fase de desmame (21 dias)	270 (204 - 356)	8,3 (7,7 - 9,0)
Adultos (60-70 dias)	531 (490 - 576)	10 (8,5 - 11,8)

Fonte: Watt et al. (1996)

Devido à complexidade da saxitoxina e suas variantes e do fato de apresentarem efeitos tóxicos semelhantes, é comum, nessas condições, a utilização de um valor que define uma potência relativa da toxicidade de cada composto em relação a um composto tóxico de referência, representando assim a toxicidade total de uma amostra. (BOTANA et al., 2010). Nesse contexto, em julho de 2006, a Comissão Europeia solicitou à Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), um parecer avaliando limites para a saúde humana e métodos de análise para várias biotoxinas marinhas, incluindo a saxitoxina. Esse documento foi publicado em 2009 e dentre diversas constatações e conclusões, foram propostos Fatores Tóxicos Equivalente para as saxitoxina e suas variantes, discriminados no quadro 1.

Quadro 1 - Fatores Tóxicos Equivalente para a saxitoxina e suas variantes

Saxitoxinas e equivalente	Fator Tóxico Equivalente
STX	1
Neo-STX	1
GTX1	1
GTX2	0,4
GTX3	0,6
GTX4	0,7
GTX5	0,1
GTX6	0,1
C2	0,1
C4	0,1
dc-STX	1
dc-neo-STX	0,4
dc-GTX2	0,2
dc-GTX3	0,4
11-hydroxy-STX	0,3

Fonte: EFSA, 2009^a

Legenda: STX - Saxitoxina; GTX - Gonialtoxina; C - toxina C; neoSTX- neo saxitoxina; dcSTX - decarbamoilsaxitoxina.

Cabe ressaltar que, além dos diferentes graus de toxicidade apresentados pelos diversos análogos da saxitoxina, o nível de intoxicação, em humanos, também varia de acordo com a sensibilidade. Foram reportados casos de consumo de 300 µg sem efeitos tóxicos e casos com esta mesma concentração que foram fatais (FUNARI; TESTAI, 2008).

Essa cianotoxina foi considerada no presente estudo, pois além dos dados de monitoramento disponibilizados pela CETESB demonstrarem a detecção de saxitoxina no reservatório Itupararanga, há registro na literatura de que as cepas brasileiras possuem os genes responsáveis por sua produção (RISSETI, 2012) e esses genes estão sendo expressos tanto para a produção de saxitoxina como também para seus análogos (LAGOS et al., 1999; RISSETI, 2012).

3.3 DIRETRIZES PARA ÁGUA TRATADA E ÁGUA DE RECREAÇÃO DE CONTATO PRIMÁRIO PARA SAXITOXINAS

Os valores diretrizes são importantes na fase de avaliação de risco, que apesar de não ter sido contemplada nesse trabalho, precisa ser contextualizada.

A análise de risco consiste em basicamente de três etapas, avaliação, gestão e comunicação de risco (GERBA et al., 2000). A avaliação de riscos, por sua vez, é constituída de 4 etapas 1) identificação de perigo; 2) avaliação da relação dose-resposta; 3) avaliação de exposição; e 4) caracterização de riscos (FREITAS, 2002). Neste contexto, o modelo conceitual proposto é um elemento importante no direcionamento de uma avaliação de risco.

Os valores utilizados como diretrizes para água potável e água de recreação de contato primário, são baseados em estudos epidemiológicos de toxicidade de onde são derivadas doses de referência (RfDs - Reference Dose) ou ingestões diárias toleráveis (TDIs - Tolerable Daily Intake). Ambos representam uma dose "segura" para os seres humanos, abaixo da qual nenhum efeito tóxico é esperado (OHIO, 2013). Os valores, de modo geral, são expressos em miligramas por quilograma de peso corporal por dia (mg.kg-dia^{-1}). No caso da saxitoxina, esse valor é expresso em micrograma por quilograma de peso corporal por dia ($\mu\text{g.kg-dia}^{-1}$) em função de sua quantificação geralmente ocorrer nessa ordem de grandeza.

Tanto RfDs como TDIs incluem fatores de segurança que variam de 3 a 3000 (OHIO, 2013) e são utilizados para suprir incertezas referentes a falta de informações, sendo geralmente

utilizado o valor de 10 para cada incerteza (U.S.EPA, 2012a). As incertezas para aplicação desses fatores referem-se à:

- Variação na sensibilidade entre os membros da população humana (variabilidade inter-humana ou intraespécie);
- Extrapolação de dados de animais para humanos (variabilidade interespécies);
- Extrapolação de dados obtidos em um estudo com exposição abaixo da vida útil à exposição ao longo da vida (extrapolação de exposição subcrônica a crônica);
- Extrapolação no uso de um valor de nível de efeito adverso mais baixo observado (LOAEL - Lowest Observed Adverse Effect Level) em vez de um valor onde não são observados efeitos adversos (NOAEL -No Observed Adverse Effect Level); e
- Extrapolação de dados de animais quando a base de dados está incompleta.

Os valores de RfD e TDIs são derivados para explicar os diferentes períodos de exposição às toxinas, incluindo uma exposição aguda, uma exposição de curto prazo, uma exposição subcrônica e uma exposição crônica (ou para toda a vida). Nem todas as toxinas têm todos os tipos de exposição avaliados (OHIO, 2013).

As exposições podem ser definidas como:

- Exposição aguda: exposição única com duração de no máximo um dia;
- Exposição de curto prazo: exposição repetida por mais de 24 horas, até 30 dias;
- Exposição subcrônica: exposição repetida por mais de 30 dias, até aproximadamente 10% do tempo de vida em humanos;
- Exposição crônica: exposição repetida por mais de aproximadamente 10% do tempo de vida em humanos.

As definições de exposições foram obtidas da lista de catálogo de vocabulário da Agência de Proteção Americana (U.S.EPA. 2011).

3.3.1 Diretrizes para Água Tratada

Fitzgerald e colaboradores, reconhecendo a importância dos valores de alerta de cianobactérias e cianotoxinas, para autoridades responsáveis pela saúde e pelo monitoramento da água, publicaram em 1999, um artigo descrevendo o desenvolvimento de níveis de alerta para diversas cianobactérias e cianotoxinas de particular interesse no sul da Austrália. Dentre as cianotoxinas descritas, a saxitoxina foi a que necessitou de uma análise mais profunda, uma vez que os níveis de alerta até então propostos estavam voltados para o consumo de mariscos contaminados e não havia evidências de efeitos na saúde humana causados diretamente pela exposição a água contendo cianobactérias produtoras de saxitoxina.

Desse modo, foi realizada uma revisão dos dados disponíveis sobre intoxicação humana relacionada a referida toxina e foi constatada uma ampla variabilidade de susceptibilidade. Diante disso, foi assumido como LOAEL, o valor de 124 µg de saxitoxina, já que, na época, não foi possível obter o NOAEL dessa cianotoxina.

Esse valor de LOAEL foi obtido de um estudo publicado em 1955 por Tennant e colaboradores. Nesse estudo foram comparadas informações obtidas de um caso de intoxicação que ocorreu em 1954 em Metis Beach, no Canadá, com as informações da época referentes à toxicidade de amostras de mariscos coletadas no mesmo local. Os valores de toxicidade foram expressos em “unidade de camundongo” (*mouse unit* – MU⁵). Na ocasião, sete pessoas de uma mesma família sofreram intoxicações após consumir mariscos, sendo que duas foram a óbito. No referido caso, duas pessoas do sexo feminino, uma com 27 e outra com 12 anos de idade, consumiram a menor dose não fatal, correspondente a aproximadamente 650 MU. Considerando que cada “*mouse unit*” corresponde a valores de 0,18 a 0,19 µg de toxina e que para o cálculo da dose média de toxina ingerida, utilizou-se o valor de 0,19 µg, o resultado obtido foi de aproximadamente 124 µg. O valor do LOAEL foi obtido pela divisão da concentração da toxina ingerida com o peso assumido para o caso, 60 kg, resultando em 2,06 µg kg⁻¹.

⁵ “Mouse unit” é a quantidade de toxina necessária para levar um camundongo de 20 g à óbito em 15 minutos através de injeção intraperitoneal. (HORWITZ, 1980 – apud LLEWELLYN e ENDEAN, 1989)

Os valores utilizados no cálculo do valor guia foram discriminados no quadro 2.

Quadro 2 - Variáveis utilizadas para o cálculo do valor guia de saxitoxina para água tratada

Variáveis	Valor
Fator de incerteza (UF)	10
LOAEL (124 µg /60kg)	2,06 µg kg ⁻¹
Peso corporal médio de um australiano	70 kg
Consumo de água por dia	2 L
P (proporção de ingestão de STX, atribuída para a água)	0,5

Fonte: Fitzgerald et al. (1999).

O fator de incerteza 10 foi utilizado em função da abordagem padrão para cálculo de valores guias que utilizam o LOAEL ao invés do NOAEL. Não foi utilizado um fator de incerteza entre espécies, pois o valor assumido refere-se à toxicidade em humanos e a proporção de ingestão de saxitoxina (P) atribuída para a água foi estabelecida em 50% (0,5), considerando que a população pode ingerir as cianotoxinas através do consumo de água e por meio do consumo de alimento contaminado (FITZGERALD et al., 1999). A fórmula do cálculo foi discriminada na equação 5.

$$\frac{\text{NOAEL ou LOAEL} \times \text{Peso corporal (kg)} \times P}{\text{UF} \times \text{Volume diário consumido (L)}} = \frac{2,06 \times 70 \times 0,5}{10 \times 2} = 3,6 \mu\text{g.L}^{-1} \text{ (5)}$$

Para facilitar a utilização do dado, o valor guia proposto para saxitoxinas em água de consumo humano foi de 3 µg.L⁻¹.

Entretanto é importante salientar que os valores diretrizes para água destinada ao consumo humano variam para diferentes locais, conforme exemplificado no quadro 3. Essas variações ocorrem em função da utilização de diferentes valores de pesos corporais e taxa de consumo de água, que são diferentes para adultos e crianças e podem variar de um país para outro.

Quadro 3 - Valores de referência para cianotoxinas para água destinada ao abastecimento público de acordo com dois estados dos EUA, Austrália e Nova Zelândia

Estado	Valores de referência para Saxitoxina em água de abastecimento público
Ohio *	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - Crianças menores de 6 anos e população sensível. 1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - Crianças com 6 anos e maiores e adultos.
Oregon**	0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - Crianças menores de 5 anos. 1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - Crianças maiores de 5 anos e adultos.
Austrália***	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Nova Zelândia***	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Fonte: * .Ohio.EPA, 2017

<http://epa.ohio.gov/Portals/28/documents/habs/2017_PWS_HAB_Response_Strategy_5-15-17-FINAL.pdf>
acesso em: 07.05.17.

**Adaptado de <<https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/guidelines-and-recommendations#what3>> acesso em: 07.05.17.

*** CHORUS, 2012.

3.3.2 Diretrizes para água de recreação

Eventos de mortandade de cães e a falta de critérios federais para exposição às cianotoxinas em água de recreação levaram as autoridades de Saúde de Oregon (OHA - Oregon Health Authority) a desenvolverem valores orientadores para as quatro cianotoxinas mais comuns na região (anatoxina-a, cilindrospermopsina, microcistina e saxitoxina). Esses valores foram baseados em dados do programa de monitoramento, sendo calculados especificamente para cada tipo de exposição: água tratada para consumo humano e exposição recreacional de humanos e cães (FARRER et al., 2015).

A ingestão diária tolerável (TDI) para saxitoxina foi calculado com base na dose de referência aguda (ARfD) de 0,5 $\mu\text{g STX-eq.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, baseado em dados da EFSA (2009a). A essa concentração aplicou-se um valor de 10 como fator de incerteza para limitações de base de dados e obteve-se um valor de 0,05 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Não foram aplicados fatores para variabilidade entre espécies, pois os estudos foram baseados em casos humanos, nem para variabilidade individual, uma vez que o estudo da EFSA abrangeu a população em geral (FARRER et al., 2015).

A dose de referência aguda de 0,5 $\mu\text{g STX-eq.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ foi estimada com base em estudos de relatos de intoxicações em seres humanos, que permitiram estabelecer a menor dose na qual um efeito é observado (LOAEL) de 1,5 $\mu\text{g STX-eq.kg}^{-1}$ por peso corporal. Considerando que

muitos indivíduos não sofreram reações adversas em doses mais altas e que seria necessário um valor que abrangesse indivíduos sensíveis foi proposto a divisão do LOAEL por um fator de 3 para deslocar o referido LOAEL e, desse modo, obter-se o NOAEL de 0,5 µg STX-eq.kg⁻¹ de peso corporal (EFSA, 2009a).

Para peso corporal, a OHA utilizou um valor restritivo baseado em crianças de 4 a 6 anos assumindo-se um valor de 20 kg. Essa faixa etária foi considerada, partindo-se do princípio que apenas crianças a partir dos 4 anos teriam maior probabilidade de uma exposição, por meio de contato primário, igual ou superior a 2 h por dia. Para contribuição relativa da fonte (CRF) foi estipulado o valor de 1 (assumindo que 100% da ingestão de cianotoxina por um indivíduo seria através ingestão de água). A taxa de ingestão para uso recreativo considerou que, se uma criança pode nadar até 2 h em água contaminada e caso ela ingira 0,05 litros por hora de natação (conforme manual de orientação de avaliação de saúde pública da Agência Estadunidense para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR), o valor final seria de 0,1 litros por dia (FARRER et al., 2015).

Os valores utilizados na obtenção do valor guia para água recreacional, baseados nos valores de Ohio, foram dispostos no quadro 4.

Quadro 4 - Valores das variáveis utilizadas no cálculo do valor guia para saxitoxina em relação à ingestão de água recreacional

Taxa de ingestão diária tolerável - TDI	Saxitoxina: 0,05µg STX-eq.kg ⁻¹ .dia ⁻¹
Peso corporal – PC (Kg)	20
Contribuição relativa da fonte - CRF	1
Taxa de ingestão - IR (L.dia ⁻¹)	0,1

Fonte: FARRER et al., 2015

A equação geral para cálculo do valor guia e os cálculos referentes à concentração de saxitoxina, utilizados pelas autoridades de saúde de Oregon, em águas destinadas a recreação de contato primário foram discriminados nas equações 6 e 7, respectivamente.

$$\text{Valor guia} = \frac{\text{Taxa de ingestão de toxina diária} \times \text{Peso corporal} \times \text{CRF}}{\text{Taxa de ingestão de água}} \quad (6)$$

$$\frac{0,05 \times 20 \times 1}{0,1} = 10 \mu\text{g.L}^{-1} \quad (7)$$

Entretanto, esses valores podem mudar significativamente de acordo com os valores assumidos nas variáveis que são consideradas no cálculo, bem como quais variáveis serão

utilizadas. Por exemplo, o departamento de Saúde do Estado de Washington determinou um valor de $75 \mu\text{g.L}^{-1}$ para saxitoxina (Equações 9 e 10).

$$\text{Valor guia} = \frac{\text{Dose de referência} \times \text{Peso corporal}}{\text{Taxa de ingestão de água}} \quad (9)$$

$$\frac{0,5 \times 15}{0,1} = 75 \mu\text{g.L}^{-1} \quad (10)$$

Considerando:

Dose de referência aguda: $0,5 \mu\text{g STX-eq.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$

Peso corporal de criança: 15 kg

Taxa de ingestão de água: $0,05 \text{L/h}$, assumindo $2 \text{h}.\text{dia}^{-1} = 0,1 \text{L}.\text{dia}^{-1}$.

Ohio, por sua vez, apresenta dois valores de alerta para saxitoxina em água destinada à recreação de contato primário, sendo considerado como valor elevado de alerta, $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e valor de alerta, $0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ (OHIO.EPA, 2016).

3.4 MÉTODOS PARA REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS DAS ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO

Considerando a importância da exposição oral de cianotoxinas por consumo de água potável e que a remoção dessas substâncias da água é um processo complexo, envolvendo a retirada das toxinas intra e extracelulares, sendo que a retirada de células de cianobactérias intactas pode ser realizada durante o tratamento convencional (coagulação, floculação, sedimentação e filtração), mas que esse processo é ineficiente para toxina dissolvida na água (FREITAS, 2007; DURIGAN et al., 2012), o conhecimento de novas técnicas e a aplicação delas de maneira conjunta pode contribuir significativamente para a redução da exposição da população.

Também se faz necessário a utilização com cautela de algicidas como o sulfato de cobre, utilizado com frequência para controlar florações, bem como o uso de ozônio na água bruta que será tratada para abastecimento público, devido ao risco de lise das células com liberação de cianotoxinas na água. Vislumbrando esse risco, o § 6º, do Art. 40, do anexo XX, da Portaria de Consolidação nº 5/2017, veta “o uso de algicidas para o controle do crescimento de microalgas e cianobactérias no manancial de abastecimento ou qualquer intervenção que

provoque a lise das células”, sendo também abordado seu uso no guia: *Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems*, da U.S. EPA, (2014).

Da mesma forma, o pré-tratamento de oxidação deve ser avaliado, pois seu sucesso depende do oxidante, da dose e das espécies de cianobactérias presentes na água (U.S. EPA, 2014). A utilização de oxidantes no processo de tratamento para água de abastecimento requer alguns cuidados, pois, esses produtos não devem, de preferência, deixar resíduos ou subprodutos tóxicos, não podem permanecer na água após o término do tratamento, devem ser eficientes, ter um custo acessível e ser facilmente manuseáveis. Assim, os oxidantes que melhor preenchem os requisitos supracitados são: ar ou oxigênio, ozônio, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio, cloro ou hipocloritos e dióxido de cloro (FREITAS, 2007).

Um dos processos que têm se apresentado bastante eficaz na degradação de cianotoxinas são os processos oxidativos avançados do tipo Fenton, que podem ter sua eficiência aumentada quando se incorpora radiação (ultravioleta ou visível), caracterizando os processos foto-Fenton. Nesse tipo de processo, oxidantes como ozônio e peróxido de hidrogênio são irradiados com luz ultravioleta ou visível na presença de catalizadores (íons metálicos ou semicondutores) para formar o radical hidroxila, que possui alto poder de redução sendo capaz de oxidar uma grande diversidade de compostos orgânicos (NOGUEIRA et al., 2007).

Porém, esses processos geralmente são aplicados em escala de bancada e os inconvenientes observados foram: estudos em bancadas são mais fáceis de controlar, a quantidade utilizada é geralmente muito inferior aos sistemas de tratamento para abastecimento e, no caso desses processos, ao se utilizar como reagentes o sulfato ferroso e o peróxido de hidrogênio, gera-se outro inconveniente. O peróxido de hidrogênio, apesar de ser tóxico, degrada-se rapidamente, mas o ferro continua no sistema e precisaria ser removido do produto final para não causar outro tipo de impacto, o lançamento de ferro no ambiente (DURIGAN et al., 2012).

Microfiltração e ultrafiltração são altamente efetivos na remoção de células intactas de cianobactérias, entretanto, para remoção de cianotoxinas dissolvidas os tratamentos mais comuns englobam a utilização de carvão ativado, membrana filtrante e inativação química com ultravioleta, desinfetantes e oxidantes (U.S. EPA, 2014). Os processos de tratamento mais utilizados e suas respectivas eficiências foram discriminados no quadro 5, baseado em U.S. EPA. 2014 e Di Bernardo et al., 2010. As demais fontes que complementam a tabela foram discriminadas individualmente.

Quadro 5 - Processo de remoção de cianotoxinas e respectivas eficiências (continua)

Processo de Tratamento	Eficiência
Remoção de cianotoxinas intracelulares (células intactas)	
Pré-tratamento com oxidação	Oxidação frequentemente lisa as células de cianobactérias liberando a cianotoxina para a água. Se a oxidação for necessária para atender outros objetivos, considerar o uso de doses mais baixas de um oxidante menos agressivo como o permanganato de potássio. Se for necessária a utilização de doses mais elevadas, utilizar doses suficientes para também destruir toxinas totais presentes.
Coagulação, Sedimentação e Filtração	Eficaz na remoção de toxinas intracelulares quando as células acumuladas no lodo são isoladas e não voltam para a água, que pode ser separada do lodo e devolvida para o sistema de tratamento.
Membranas	Os dados de estudos são limitados. Assume-se que as membranas são eficazes para a remoção de cianotoxinas intracelulares. Microfiltração e ultrafiltração são eficazes quando as células não se acumulam sobre elas por longos períodos de tempo.
Flotação	Flotação com ar dissolvido é eficaz para a remoção de cianotoxinas intracelulares, uma vez que a maioria das cianobactérias potencialmente produtoras de toxina flutuam.
Remoção de cianotoxinas extracelular (dissolvida)	
Membranas	Depende do material, a distribuição de tamanho dos poros e da qualidade da água. Estudos realizados por Brandão e Amorim (2012) demonstraram que a remoção de três variantes da saxitoxina (STX, neo-STX e dC-STX) extraídas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> por nanofiltração em membranas de poliamida e acetato de celulose, foi diferente para cada variante e dependeu do tempo de contato com as membranas. Também se verificou que o pH pode influenciar na remoção de neo-STX, mas não a remoção de STX e dC-STX. E que apesar da saxitoxina ter peso molecular semelhante ao β -estradiol a remoção da Neo-STX foi diferente quando se compara a remoção das duas substâncias, sugerindo que há outros fatores além do tamanho da molécula, que interferem na remoção, como por exemplo a natureza da toxina (hidrofílica ou hidrofóbica).
Cloraminas	Não efetivo

Quadro 5 - Processo de remoção de cianotoxinas e respectivas eficiências (fim)

Processo de Tratamento	Eficiência
Dióxido de cloro	Não efetivo em doses usadas no tratamento de água para abastecimento.
Cloração	Sua efetividade depende da dosagem, do pH, do tempo de contato e da seleção do ponto de aplicação, pré ou pós-oxidação (VERONEZI, et al. 2009). Eficaz para oxidar cianotoxinas extracelulares, quando o pH for inferior a 8. (EPA, 2014). Estudos de Nicholson et al. (2003) demonstraram que a degradação de saxitoxinas não é linear com o aumento do pH e a remoção mais significativa ocorre com pH de 7,4 para saxitoxinas e de 8,8 para goniautoxinas. A remoção de mais de 90% das cianotoxinas testadas ocorreu com pH de 9,0 e cloro residual livre de 0,5 mg/L após 30 minutos de tempo de contato. Avaliação realizada por Veronezi et al. (2009) demonstrou que em 30 ou 60 minutos os resultados para remoção de $15,80 (\pm 0,20 \mu\text{g.L}^{-1})$ de saxitoxina a um pH de $(6,3 \pm 0,2)$, com dosagens de 0,9; 1,2 e 1,5 variaram de aproximadamente 60% a 80%. Quanto à cilindrospermopsina, Merel et al. (2010) estudaram os efeitos do cloro sobre essa toxina e constataram a diminuição da sua concentração e a transformação desta em mais três subprodutos. Também constataram que após a cloração houve decréscimo da toxicidade. Eles concluem que serão necessários novos estudos para confirmar a diminuição da toxicidade após a cloração em outras linhagens celulares e aprimorar o entendimento da transformação química da cianotoxina.
Radiação UV	Eficaz mas em doses impraticavelmente altas.
Carvão Ativado em pó (CAP)	Eficácia varia muito dependendo do tipo, do tamanho dos poros e da quantidade de matéria orgânica (compete com os sítios ativos). Os carvões derivados de madeira são geralmente os mais eficazes na adsorção microcistina. Não é tão eficaz na adsorção de compostos de saxitoxina. Doses superiores a 20 mg/L podem ser necessárias para a remoção completa das toxinas dissolvidas (EPA, 2014). Estudo realizado por Veronezi et al. (2009), confirmaram que, de modo geral, os CAPs de madeira são mais eficientes na remoção de cianotoxinas. No caso, foram testados CAPs de madeira, osso e mineral para remoção de saxitoxina (concentração inicial de $24,8 \mu\text{g/L}$), e o CAP de madeira removeu, em média, 58% da saxitoxina.
Ferrato de Potássio	Sal de ferro que atua como oxidante em toda a escala de pH, sendo os contaminantes de efluentes líquidos removidos em segundos ou minutos. Tem se mostrado bastante eficaz na decomposição de cianotoxinas. O problema é o ferro residual acima de $0,2\text{mg/L}$.

Fonte: Adaptado de U.S. EPA. (2014) e Di Bernardo et al. (2010). As demais fontes que complementam a tabela foram discriminadas individualmente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Reservatório Itupararanga

O reservatório Itupararanga situa-se a sudoeste da Região Metropolitana de São Paulo, com clima caracterizado por verão chuvoso e inverno seco (FRASCARELI, et al., 2015). O corpo d'água está inserido na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHI 10, 23°36'/47°23', bacia do Alto Sorocaba e Médio Tietê (PEDRAZZI et al., 2014). É formado pelos rios Sorocabaçu, Sorocamirim e Una e a área de sua bacia de drenagem possui 929 km² abrangendo os municípios de Alumínio, Cotia, Ibiúna, Mairinque, Piedade, São Roque, Vargem Grande Paulista e Votorantim. A área do referido reservatório é de 29,9 km², sua profundidade média de 7,8 m e tempo de residência médio anual de 250 dias (FRASCARELI, et al., 2015). Esse corpo d'água possui volume útil de 286×10^6 m³ (TANIWAKI, 2012). A figura 3 é uma imagem aérea ilustrando o reservatório do Itupararanga e a figura 4 são fotos tiradas da barragem.

Figura 3 - Imagem aérea do reservatório Itupararanga com demarcação



Fonte: GOOGLE EARTH, ([2017?])

Figura 4 - Fotos da barragem do reservatório Itupararanga



Fonte: Luciana Haipek Mosolino Lerche. 2017.

Esse reservatório começou a ser construído em 1912 pela empresa São Paulo Eletric Company (Light) para a geração de energia elétrica (PEDRAZZI et al., 2014). Em 1998, com o objetivo de proteger o corpo d'água e sua biodiversidade, foi criada a Lei Estadual nº 10.100, que definiu a área de seu entorno como Área de Proteção Ambiental (APA), sendo então regulamentada pela Lei Estadual nº 11.579/2003 (FRASCARELI, et al., 2015).

Atividades de Recreação

Os municípios que englobam o referido reservatório, são os de Alumínio, Cotia, Ibiúna, Mairinque, Piedade, São Roque, Vargem Grande Paulista e Votorantim. Há clubes náuticos em suas margens além de praias municipais (TRIPADVISOR LLC, [2016?]). Apenas a praia do Escritório, recebe 4.000 pessoas nos finais de semana de verão (IBIUNA, 2011).

Abastecimento Público

Atualmente a água proveniente do reservatório Itupararanga é utilizada para abastecimento público nos municípios de Sorocaba e Votorantim. As empresas fornecedoras de água potável e respectivos locais de captação foram dispostos no quadro 6.

Quadro 6 - Municípios que utilizam água do reservatório Itupararanga para abastecimento, empresas fornecedoras de água potável, locais de captação e Referência de informações

Município	Fornecedor de água	Captação	Referência
Sorocaba	Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE)	Reservatórios do Clemente/Itupararanga	http://saesorocaba.com.br/site/?page_id=178 , 18.08.2016
Votorantim	Concessionária Águas de Votorantim	Res. Itupararanga e um poço tubular.	http://www.grupoaguasdobrasil.com.br/aguas-votorantim/agua-e-esgoto/eta/ >acesso em 05.06.2017

O município de Sorocaba não é banhado pelo reservatório Itupararanga, mas é abastecido por ele. A empresa Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) é responsável pela captação, tratamento e distribuição de água nesse município, que abastece 85% da população com água proveniente dos reservatórios do Clemente/Itupararanga e Ipaneminha, 10% com água captada no córrego Piragibu-Mirim e 5% nos 23 poços tubulares profundos distribuídos pela cidade (SAAE, [2018?]a). Durante a visita realizada na ETA Cerrado do SAAE, foi informado que o reservatório Ipaneminha apenas complementa a captação da água em períodos de maior demanda, mas a principal fonte de água é do reservatório Clemente (figura 5), que recebe água do Itupararanga. Antes de ser distribuída à população, a água passa pelo processo convencional de tratamento que consiste em pré-desinfecção, fluoretação; coagulação e floculação; decantação; correção de pH e filtragem. (SAAE, [2018?]b).

Figura 5 – Imagem de satélite com a localização do reservatório Clemente



Fonte: GOOGLE EARTH, (2017)

No município de Mairinque a captação de água para abastecimento público é realizada nos mananciais Fiscal e Carvalhal e em 18 poços de captação de água subterrânea. De acordo com SANEAQUA ([2017?]) o reservatório Fiscal seria um braço do reservatório Itupararanga, porém, o Fiscal é um dos formadores do reservatório Itupararanga e não exatamente o braço do Itupararanga (figura 6).

Figura 6 – Imagem de satélite da aérea do local de captação de água de Mairinque, no reservatório Fiscal



Fonte: GOOGLE EARTH, (2017)

O município Votorantim é abastecido pela empresa Águas de Votorantim, formada pelos acionistas: Grupo Águas do Brasil e Sistema de Gestão Ambiental. Essa empresa administra quatro estações de tratamento de água: ETA Central que atende 75.542 habitantes, ETA Votex que atende 6.786 habitantes, ETA Votocel que atende 17.975 habitantes e ETA Novo mundo que atende 11.684 habitantes, além de um poço tubular que atende 268 habitantes (ÁGUAS DE VOTORANTIM, [2017?]). Considerando que 0,2% da população é atendida por água proveniente de poço tubular, e que o restante 99,8% é atendida pelas ETAs, optou-se por considerar 100% da população como abastecida pelo reservatório.

A população estimada que recebe água do reservatório Itupararanga é de 640.843 habitantes. Essa estimativa baseou-se na soma dos seguintes valores:

- 521.985 habitantes: esse valor corresponde a 85% da população estimada para 2016 no município de Sorocaba, 652.481 habitantes. (<https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/sp/sorocaba/panorama>, acesso em 15.06.17).

- 118.858 habitantes: esse valor corresponde a 100% da população estimada em 2016 no município de Votorantim (<https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/sp/votorantim/panorama>, acesso em 15.06.17).

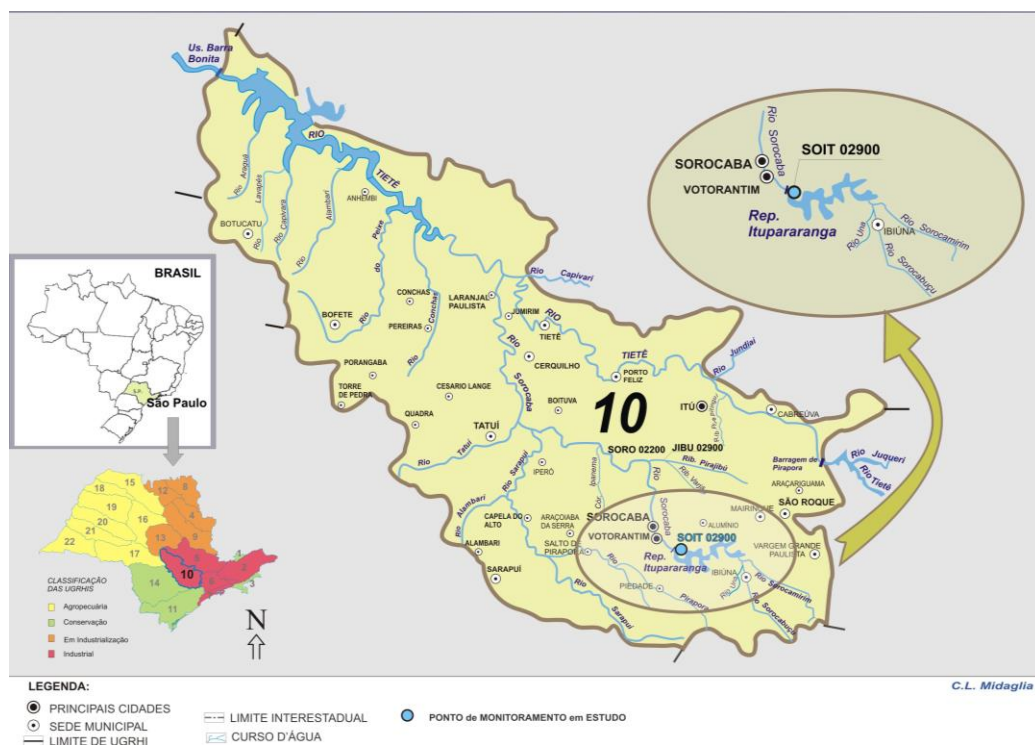
Monitoramento CETESB

O reservatório Itupararanga faz parte da rede de monitoramento de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, órgão vinculado à Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Seu monitoramento, em relação a composição da comunidade fitoplanctônica e densidade de células de cianobactérias, teve início em 2002, no ponto situado próximo à barragem (SOIT 02900). Nessa época foram realizadas apenas duas amostragens, para fins de avaliação prévia do local.

A CETESB possui dois pontos de monitoramento de balneabilidade, onde são realizadas amostragens semanais com análises que envolvem variáveis bacteriológicas, e dois pontos para monitoramentos da rede básica, um situado próximo da barragem e outro no corpo central, que envolvem análises químicas, físicas, bacteriológicas e hidrobiológicas, com amostragens realizadas quatro vezes ao ano.

No presente estudo foram utilizados apenas os dados referentes ao ponto próximo da barragem, na estrada que liga Ibiúna a Votorantim, Latitude: 23°36'42'' e Longitude: 47°23'52'' (SOIT 02900), conforme ilustrado na figura 7, que mostra a localização do reservatório e do ponto de coleta. A seleção do ponto foi feita em função da elevada ocorrência, frequência e densidade de organismos do gênero *Cylindrospermopsis*, e do fato de estar próximo ao local onde ocorre a captação de água para abastecimento público.

Figura 7 – Localização do reservatório Itupararanga na UGRHI 10 – Sorocaba e Médio Tietê e do ponto de coleta de onde foram utilizados os dados. SOIT 02900



Fonte: Carmen Midaglia. 2018

4.2 AMOSTRAGEM E TRANSPORTE

As amostragens de água foram realizadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos (BRANDÃO et al., 2011), pela Divisão de Amostragens da CETESB, em períodos considerados chuvosos e de temperaturas mais elevadas (janeiro e novembro) e em períodos considerados secos e geralmente com temperaturas mais amenas (maio e julho) totalizando quatro amostragens anuais. O período do estudo compreendeu 2015 e 2016, totalizando oito amostras.

Para as análises quantitativas de identificação e contagem de células de cianobactérias, e quantificação de saxitoxina equivalente foram realizadas amostragens na sub-superfície do corpo d'água, com balde de alumínio. As amostras foram armazenadas em frasco de vidro âmbar de 1 L de capacidade, com amostra preenchendo aproximadamente $\frac{3}{4}$ da capacidade do frasco.

O transporte ocorreu sob refrigeração (4°C a 10°C) em caixas térmicas com gelo até o laboratório em prazo inferior a 24 horas.

4.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Cianobactérias

A metodologia para a análise de identificação e contagem de cianobactérias baseou-se em: Utermöhl (1958), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA – AWWA – WEF, 2012) Seção 10200 A, B, C, D, E e F, na Norma Técnica CETESB L5.303 (2012) e Chorus & Bartram (1999).

Em laboratório, um volume de 5 mL da amostra era transferido à uma câmara de Utermöhl para observação sob luz de epifluorescência para a diferenciação entre as cianobactérias e bactérias. A segunda etapa constou da preservação de, aproximadamente, 100 mL da amostra com cerca de 0,5 mL de lugol-acético, que foi acondicionada em frasco âmbar e armazenamento em local escuro para posterior análise.

A análise foi realizada transferindo-se uma alíquota da amostra para câmaras de sedimentação de Utermöhl, que permaneceram em repouso em uma câmara úmida para a sedimentação dos organismos. Após o período de sedimentação, mínimo de 1 hora por mm de altura da câmara (APHA, 2006), as mesmas foram analisadas em microscópio invertido Zeiss, sob o aumento de 400X e com o auxílio do retículo de Whipple, aferido com régua micrométrica calibrada, em transectos, garantindo desta forma precisão dos resultados. A quantidade de células de cianobactérias contabilizada foi multiplicada pelo fator de concentração (Fórmula 1) e desse modo convertida em concentração por unidade de volume da amostra e o resultado expresso em número de células de por mililitro (mL) (CETESB, 2012).

Fórmula 1

$$F = \frac{A / a''}{V}$$

Onde:

F = Fator de concentração

A = área da câmara de Utermöhl

a'' = área de um transecto

V = volume da câmara (mL)

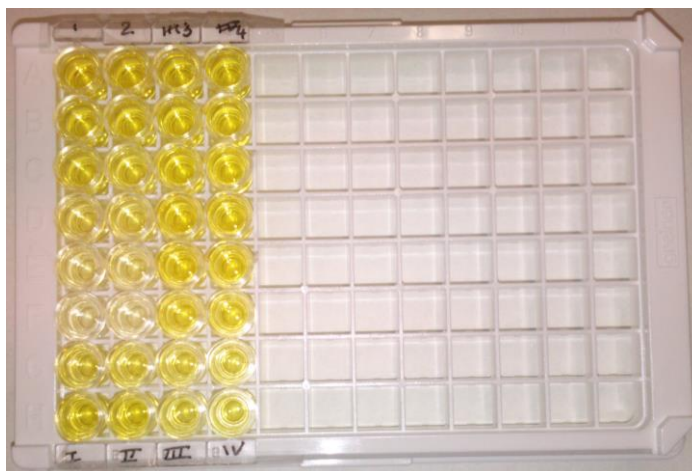
A identificação de gêneros e espécies levou em consideração características morfológicas como dimensões e formato de tricomas, células e acinetos, quando presentes. Foram consultados os autores: KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS (1989, 1998, 2005), KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ e CRONBERG (1994), SANT' ANNA et al. (2006), KOMÁREK (2013) e artigos científicos pertinentes na área de taxonomia.

Total de Saxitoxinas e análogos

Para detecção do total de saxitoxina e análogos, que inclui a porção que se encontra livre na água e a que ainda permanece dentro das células, a amostra de água foi congelada e descongelada por três vezes e depois foi submetida a ultrassom (50 Hz por 15 minutos) em banho de gelo, para que ocorresse a lise das células.

A análise foi realizada pelo método imunoenzimático de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – método de competição com antígeno marcado – utilizando o kit, Saxitoxin (PSP) ELISA Kit (Microtiter plate format, 96T) PN 52255B, da empresa ABRAXIS. Nesse tipo de ensaio as microplacas sensibilizadas com anticorpo específico são incubadas com a amostra e com o conjugado antígeno-enzima (foto 2). Após o período de reação em que ocorre a competição da amostra e do conjugado pelos sítios de ligação com o antígeno, foi realizada a lavagem para retirada dos reagentes não aderidos à microplaca e adicionou-se o substrato específico para enzima. A reação enzimática foi interrompida e fez-se leitura a 450 nm em espectrofotômetro para microplacas. Nesse ensaio a relação entre a concentração do antígeno na amostra e no controle (padrão de toxina fornecida pelos kits com concentração conhecida) é inversamente proporcional. Os kits de microplacas para teste de ELISA (Figura 8) empregados nesse estudo fornecem padrões da saxitoxina e equivalente totais a ser detectada em diferentes concentrações para construção da curva dose-resposta (curva de calibração). Desta forma, por meio da interpolação da curva de calibração foi possível calcular a concentração de saxitoxina e equivalente presente na amostra. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g. STX eq. L}^{-1}$ (micrograma de equivalente de saxitoxina por litro) e o limite de quantificação do método foi $0,02 \mu\text{g. STX eq. L}^{-1}$.

Figura 8 – Foto de microplaca com amostras sensibilizadas com anticorpo específico para saxitoxina



Fonte: Luciana Haipek Mosolino Lerche, CETESB. 2017.

A sensibilidade do kit variou de acordo com a reatividade do antígeno/anticorpo relativa às variantes da SXT (Quadro 7).

Quadro 7 – Porcentagem de reatividade da saxitoxina e variantes do kit ELISA da empresa ABRAXIS

Saxitoxinas e variantes	Reatividade
Saxitoxina (STX)	100 %
Decarbamoil STX	29%
GTX 2 e 3	23%
GTX-5B	23%
Sulfo GTX 1 e 2	2.0%
Decarmaboil GTX 2 e 3	1.4%
Neo STX	1.3%
Decarmaboil Neo STX	0.6%
GTX 1 e 4	<0,2%

4.4 LEVANTAMENTO DE DADOS

O levantamento referente aos resultados das concentrações totais de células de cianobactérias e de células do gênero *Cylindrospermopsis* foram obtidos a partir das fichas de leitura utilizadas nas análises realizadas no programa de avaliação da qualidade das águas

superficiais do estado de São Paulo, operação e manutenção das redes de monitoramento da CETESB. Os resultados de saxitoxina e seu análogos foram compilados do Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo da CETESB, Parte 1, Águas Doces dos anos de 2015 e 2016.

4.5 VARIÁVEIS DO MODELO CONCEITUAL DE EXPOSIÇÃO E CÁLCULO DA TAXA DE INGESTÃO

As variáveis utilizadas na composição do modelo conceitual de exposição para o reservatório Itupararanga foram discriminadas separadamente em função de suas peculiaridades. Por exemplo, para a via de exposição foi elaborada uma justificativa em relação ao contexto do trabalho, já em relação a concentrações de saxitoxinas e população exposta foi informado de onde os valores foram extraídos.

O cenário de exposição construído para esse estudo servirá para estimar a ingestão diária crônica (IDC), que representa a quantidade de saxitoxina que ingressa nos organismos dos indivíduos (crianças e adultos) expostos pelo consumo de água potável e ingestão de água durante a atividade de recreação. Esse IDC é expresso em $\mu\text{g STX eq. kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia.

4.5.1 Concentração de equivalente de saxitoxina

Os dados de equivalente de saxitoxina utilizados no modelo conceitual foram obtidos no monitoramento da CETESB de 2015 e 2016, sendo que o valor mínimo encontrado foi de $0,04 \mu\text{g. equivalente STX eq. L}^{-1}$ e o valor máximo, $0,37 \mu\text{g. equivalente STX eq. L}^{-1}$.

4.5.2 Via de exposição

De modo geral, as exposições às cianobactérias e suas toxinas podem ocorrer de diversas maneiras, porém, nesse trabalho foram consideradas apenas ingestão de água potável e ingestão de água acidental durante atividade de recreação de contato primário.

Apesar da exposição de recreação de contato primário envolver outras vias de exposição, como a dérmica e a inalação, essas não foram consideradas em decorrência da dificuldade de se mensurar os inúmeros fatores que incidem sobre a absorção de qualquer substância. Por exemplo, a inalação depende da fisiologia e resistência da mucosa nasal, que variam de acordo com a idade, a temperatura ambiental, processos inflamatórios, ingestão de álcool, prática de exercícios, dentre outros (FONSECA et al. 2006).

4.5.3 População exposta

Para a elaboração de um cenário de exposição assumiu-se como população exposta crianças de até 5 anos e adultos com idade igual ou maior de 21 anos até 70 anos, uma vez que adultos e crianças apresentam sensibilidades diferentes. Nesse cenário foi considerada uma condição extrema em que não há remoção de saxitoxina e análogos na estação de tratamento de água.

Esse reservatório ainda é utilizado como área de lazer para recreação por contato primário, sendo estimadas taxas de ingestão de água para crianças e para adultos, por dia de atividade.

4.5.4 Taxa de ingestão de água

Água potável

A obtenção das taxas de consumo de água potável foi baseada em estudo realizado pela USDA (United States Department of Agriculture) no período de 1994 a 1996 e em 1998, por meio de entrevistas realizadas com mais de 20.000 indivíduos, distribuídos em 50 Estados e no Distrito de Columbia, em dois dias não consecutivos. Dessas entrevistas foram obtidos dados sobre ingestão de água de consumo e desse modo foi possível estimar, por faixa etária, a média e percentis 90 e 95 da distribuição da ingestão diária média per capita de água em mL/pessoa/dia e, então se estimou a ingestão diária média por peso (mL/kg/dia) (KAHN e STRALKA, 2009). Essas estimativas foram multiplicadas pela média ponderada do peso corporal no Estado de São Paulo (IBGE, 2008), para fornecer as estimativas de média e percentil 90 para ingestão diária de água por pessoa (ml/dia). Com base nesses parâmetros, uma distribuição lognormal foi ajustada para cada faixa etária: crianças menores de 5 anos e adultos maiores de 21 anos. Esses dados foram utilizados por SATO et al. (2013), para avaliar o risco de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* em água potável da rede pública no estado de São Paulo, com ingestão média de água e desvio padrão (DP) de 0,44L/dia (DP 0,92L/dia)

para crianças menores de 5 anos e de 1,5L/dia (DP 0,80 L/dia) para adultos maiores de 21 anos.

Não estão disponíveis dados das concentrações de saxitoxina na água captada e tratada do reservatório de Itupararanga, assim para o cenário avaliado foi considerado que não ocorre remoção das cianotoxinas no processo de tratamento convencional da água.

Água para recreação

Para taxa de ingestão de água durante a atividade de recreação de contato primário foram utilizados dados do estudo de DUFOUR et al. (2006), que envolveu a participação de 53 indivíduos, classificados como não adultos (menores de 18 anos) e adultos (maiores de 18 anos), que nadaram em piscina durante 45 minutos. A ingestão de água entre indivíduos não adultos variou de 0 a 154 mL, sendo que 97% ingeriram 90 mL ou menos. Já os adultos ingeriram de 0 a 53 mL de água. Os valores médios foram de 37 mL e 16 mL para crianças e adultos, respectivamente. Transformando esses valores em mL por hora obtivemos os seguintes valores: 49 mL.h⁻¹ e 21 mL.h⁻¹. Assumindo 2 horas por dia de natação (FARRER, et. al., 2015), obteremos taxas de ingestão de 98 mL (0,098L) para crianças e 42 mL (0,042L) para adultos, por dia de atividade.

4.5.5 Frequência e duração da exposição

Para consumo de água potável assumiu-se como frequência de exposição 365 dias por ano para adultos e crianças. Já a duração da exposição, assumiu-se a idade de 5 anos para crianças e 70 anos para adultos.

Para a frequência de exposição em água de recreação de contato primário foi assumida uma distribuição triangular, onde foram considerados três valores (em dias) de exposição. O maior valor assumido foi de 115 dias, o valor médio (considerado o mais provável) foi de 42 dias e o valor mínimo foi de 6 dias. Todos esses valores foram calculados com base no calendário de 2016.

Para a obtenção do maior valor para recreação (115 dias) considerou-se a quantidade, em dias, de sábados, domingos e feriados (sem considerar as emendas) que foram: 53 sábados, 52 domingos e 10 feriados.

Para o valor mais provável (42 dias) considerou-se que atividades de recreação são preferencialmente exercidas durante os dias de verão (agradáveis termicamente para o tipo de atividade), excluíram-se da contagem os meses de maio a agosto, pois costumam apresentar temperaturas mais baixas. Desse modo, adotou-se 8 feriados e 34 domingos, totalizando 42 dias de exposição por ano.

O valor mínimo estabelecido no cenário foi seis dias, em função das comemorações de final de ano e carnaval (PINTO, 2016).

Em relação à duração da exposição, é importante destacar que os dados da literatura variam de acordo com o objetivo do estudo, por exemplo, a exposição em piscina é diferente da exposição que ocorre no mar e em reservatórios. Desse modo, para crianças assumiu-se o valor mais restritivo possível, 5 anos, e para adultos assumiu-se 30 anos como sendo uma duração razoável para uma população que apresenta como tempo de vida médio de 70 anos, e não o utilizam o reservatório todos os anos.

4.5.6 Peso corporal

O peso corporal assumido para crianças de 5 anos foi de 20 kg, respaldado no valor assumido pelas autoridades de Saúde de Oregon (FARRER et al., 2015). Já para o peso de adultos adotou-se 60 kg, baseado no Guia de qualidade de água tratada da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2017).

4.5.7 Equação da ingestão diária crônica

A ingestão diária crônica (IDC), em inglês denominada como Chronic Daily Intake (CDI) baseada no cenário de exposição construído para esse estudo de caso, foi calculada de acordo com a equação 10 (U.S.EPA, 2001). Esses valores representam a determinação das concentrações da saxitoxina que estarão em contato com a população exposta durante o período de exposição e em relação ao peso corporal.

$$IDC = \frac{C \times TI \times FE \times DE}{PC \times TE} \quad (10)$$

Onde:

IDC = Ingestão diária crônica de um contaminante químico ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$),

C = concentração do químico no meio ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),

TI = Taxa de ingestão ($\text{L} \cdot \text{dia}^{-1}$),

FE = Frequência de exposição (dias/ano),

DE = duração da exposição (ano),
 PC = Peso corporal (kg),
 TE = tempo médio de exposição (FE x DE) (dias).

4.5.8 Cálculo da ingestão diária crônica e tratamento de incertezas e variabilidade

O cálculo da ingestão diária crônica (IDC) foi realizado utilizando-se o método de Monte Carlo por meio do *software* Crystal Ball® (Oracle), que realizou 10.000 iterações das distribuições dos parâmetros utilizados no cálculo do IDC, desse modo, tratando as incertezas e variabilidades dos dados de exposição.

Os resultados obtidos equivalem aos intervalos de IDC com grau de confiança de 95%, sendo também obtidos os valores médios e medianos além da análise de sensibilidade, a qual aponta as variáveis que mais impactaram nos valores de exposição diária.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células de cianobactérias no reservatório Itupararanga em relação à concentração de saxitoxinas.

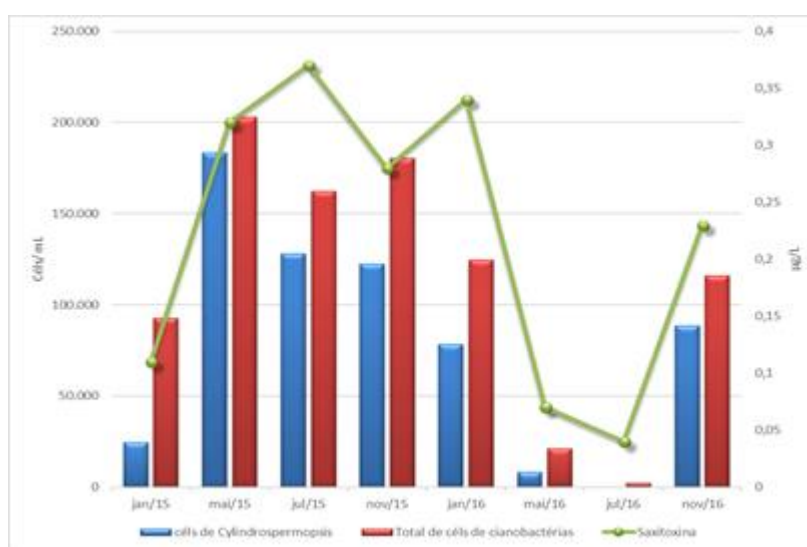
No período de 2015 e 2016, foram coletadas 8 amostras, que evidenciaram concentrações de células de cianobactérias superiores a 90.000 céls.mL⁻¹ em 75% das amostragens (Tabela 3), sendo que o maior valor total de células de cianobactérias foi obtido em maio de 2015 (203.082 céls.mL⁻¹) e o menor em julho de 2016 (2.216 céls.mL⁻¹), quando houve uma queda considerável no valor de células de cianobactérias totais. Considerando os dados históricos do monitoramento da CETESB, concentrações tão baixas de células de cianobactérias totais foram obtidas pela última vez em setembro de 2007, quando o valor foi de 2.290 céls.mL⁻¹. A porcentagem de células de *Cylindrospermopsis* sobre as demais células de cianobactérias encontradas evidencia a dominância desse organismo sobre os demais gêneros de cianobactérias na maioria das amostragens.

Tabela 3 - Densidades de células de cianobactérias (cél.s.mL⁻¹) e de células de *Cylindrospermopsis* (cél.s.mL⁻¹), porcentagem de células de *Cylindrospermopsis* em relação ao total de células e concentração de saxitoxina e análogos (µg. equivalente STX.L⁻¹) no Reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016

Variáveis	jan/15	mai/15	jul/15	nov/15	jan/16	mai/16	jul/16	nov/16
Total de céls de cianobactérias (cél.s.mL ⁻¹)	92.702	203.082	162.185	180.561	124.557	21.177	2.216	115.920
Céls de <i>Cylindrospermopsis</i> (cél.s.mL ⁻¹)	24.503	183.421	128.115	122.572	78.409	8.226	0	88.560
% de céls de <i>Cylindrospermopsis</i>	26	90	79	68	63	39	0	76
Saxitoxina (µg.L ⁻¹)	0,11	0,32	0,37	0,28	0,34	0,07	0,04	0,23

Em relação à legislação, as concentrações de células de cianobactérias ultrapassaram o estabelecido na Resolução CONAMA 357/2005 para classe 2 (50.000 células.mL⁻¹) em praticamente todas as amostragens realizadas, excetuando-se as de maio e julho de 2016. Quanto às cianotoxinas, o monitoramento da CETESB é realizado para saxitoxinas, cujas concentrações variaram de 0,04 a 0,37 µg. equivalente STX.L⁻¹, permanecendo abaixo do limite estipulado no anexo XX, da Portaria de Consolidação nº 5/2017 para água de abastecimento público, que é de 3 µg. equivalente STX. L⁻¹ (Figura 9).

Figura 9 - Concentrações de células de *Cylindrospermopsis* (cél.s.mL⁻¹), total de células de cianobactérias (cél.s.mL⁻¹) e concentração de saxitoxina (µg. equivalente STX.L⁻¹) no reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016

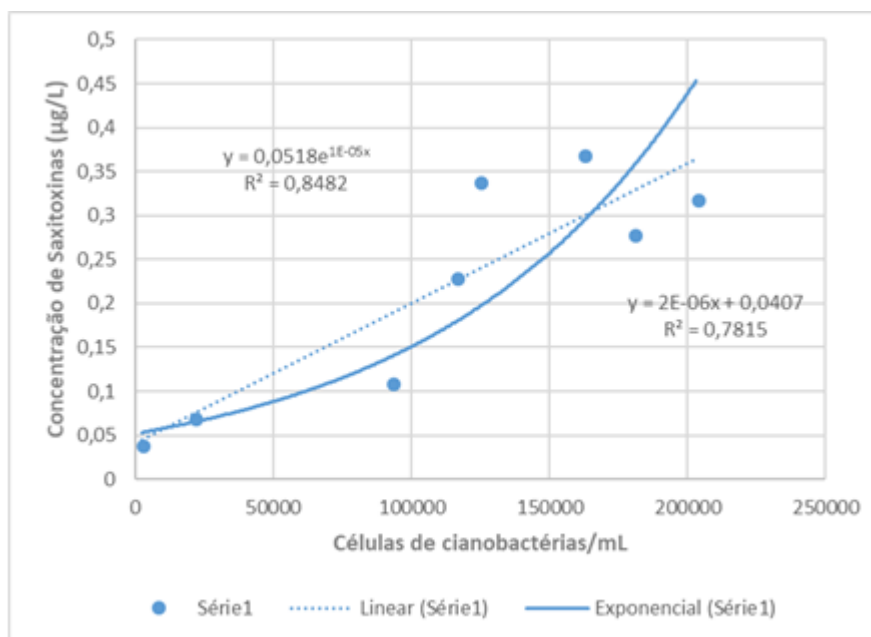


De modo geral, as concentrações de saxitoxina na água bruta do reservatório acompanharam as densidades de células de cianobactérias. Em julho de 2015 e janeiro de 2016, a situação se

inverteu, as densidades celulares diminuíram, mas as concentrações de saxitoxina aumentaram isso provavelmente ocorreu em função da ocorrência de maior densidade de células de linhagens que produziram maior concentração de saxitoxina em relação aos análogos, sendo desse modo, detectada mais eficientemente pelo kit.

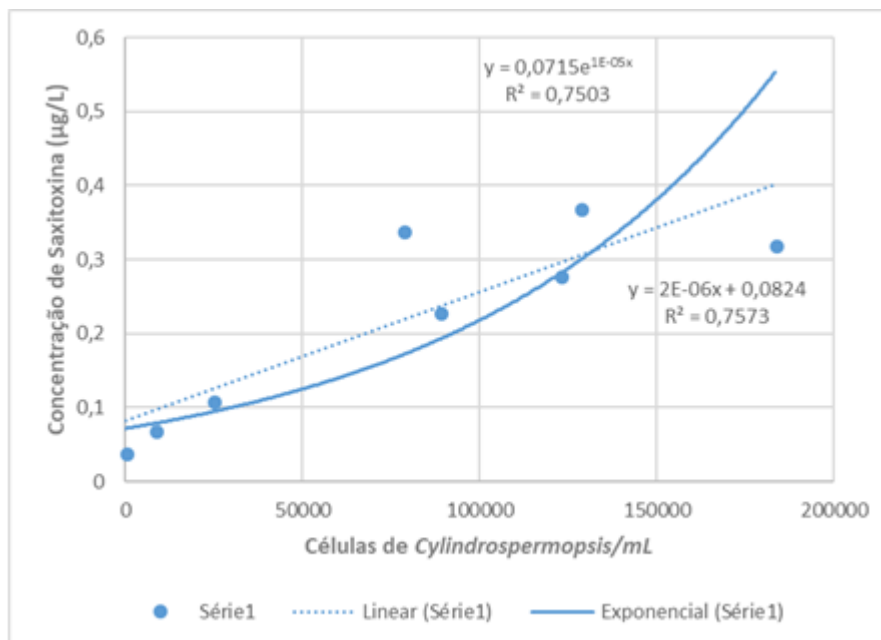
Apesar de número reduzido de dados foi possível observar, no período estudado, uma alta correlação, tanto entre o número de células de cianobactérias, como de células de *Cylindrospermopsis* com as concentrações de saxitoxina e análogos encontradas (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Dispersão entre as concentrações de células de cianobactérias totais (cél.s.mL⁻¹), e as concentrações de saxitoxina (µg. equivalente STX.L⁻¹) no reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016



O coeficiente de determinação (R^2) da regressão exponencial foi de 0,84 e da linear foi de 0,78.

Figura 11 - Dispersão entre as concentrações de células de *Cylindrospermopsis* (cél.s.mL⁻¹), e concentrações de saxitoxina (µg. equivalente STX.L⁻¹) no reservatório Itupararanga. São Paulo. 2015 e 2016



O coeficiente de determinação da regressão exponencial foi de 0,7503 e o da linear foi de 0,7573.

Esses coeficientes de determinação obtidos evidenciaram uma correlação positiva e elevada entre as variáveis: quantidade de células de cianobactérias e concentração de células de cianobactérias. Essas análises também mostraram que a correlação das concentrações de saxitoxina foi maior em relação à quantidade de células de cianobactérias totais do que em relação apenas a quantidade de células de *Cylindrospermopsis*, que pode ser explicado pela presença de outro gênero também potencialmente produtor de saxitoxina, o *Aphanizomenon*, com quantificação celular inferior ao gênero *Cylindrospermopsis*, o que significa que esse outro gênero também pode estar produzindo e liberando essa toxina para a água.

Esses dados indicaram que as condições ambientais do reservatório Itupararanga contrapõem o argumento de alguns trabalhos a respeito da falta de linearidade entre células de cianobactérias e concentrações de cianotoxinas que ocorre em algumas situações em função da existência de cepas produtoras e não produtoras de toxina coexistindo no mesmo ambiente (CARMICHAEL e GORHAM, 1981), e da existência de inúmeros gatilhos ambientais

envolvidos na produção e liberação das cianotoxinas (KURMAYER e CHRISTIANSEN, 2009).

Os fatores discutidos acima, presença de linearidade entre a correlação de quantidade de células de cianobactérias e concentrações de saxitoxinas na água e quantificação de outro gênero que provavelmente também está produzindo a saxitoxina podem se configurar em intensificação de risco a saúde humana.

Concentração de saxitoxinas no reservatório Itupararanga e legislação

Considerando que o tratamento convencional não remove eficientemente as saxitoxinas e análogos dissolvidos na água, a comparação das concentrações obtidas na água bruta do reservatório Itupararanga com o valor estabelecido no anexo XX da Portaria de consolidação nº 5/2017 (3 µg. equivalente STX.L⁻¹), evidenciaram que tais valores estiveram inferiores em todas as amostragens, sendo que o maior valor obtido foi de 0,37 µg. equivalente STX.L⁻¹. Portanto, em relação à legislação brasileira para água potável, não foi evidenciado risco toxicológico agudo para nenhuma das exposições, consumo de água potável e ingestão acidental durante atividade de recreação de contato primário.

Essas concentrações de saxitoxinas obtidas no monitoramento da CETESB também estiveram abaixo dos valores de alerta adotados por Ohio, para saxitoxina em água destinada à recreação de contato primário, 0,8 µg equivalente STX.L⁻¹ e para nível de alerta considerado elevado, 3 µg equivalente STX.L⁻¹ (OHIO.EPA, 2016). Não apresentando risco evidente para a população exposta.

Entretanto, os valores recomendados pelos estados americanos de Ohio e Oregon, para saxitoxina na água de abastecimento público, para crianças menores de 6 anos e população sensível (0,3 µg equivalente STX.L⁻¹), podem indicar um cenário preocupante uma vez que, aproximadamente 40% das amostragens estiveram com valores de saxitoxina acima desse valor (0,32 µg equivalente STX.L⁻¹, 0,37 µg equivalente STX.L⁻¹ e 0,34 µg equivalente STX.L⁻¹, em maio e julho de 2015 e janeiro de 2016) e, de acordo com a literatura, a remoção dessas toxinas dissolvidas na água não ocorre de forma eficiente no tratamento convencional (FREITAS, 2007; DURIGAN et al., 2012) e sua degradação ambiental depende de muitos fatores (KLITZKE e FASTNER, 2012; CHISWELL et al., 1999; JONES e NEGRI, 1997; INDRACENA e GILL, 2000).

Assim, considerando a importância dos valores de alertas em tomadas de decisão no âmbito das políticas públicas do estado e a necessidade de ações integradas de órgãos públicos de Saúde, Meio Ambiente e Recursos Hídricos na gestão da qualidade dos mananciais, o Comitê Permanente para Gestão Integrada da Qualidade da Água destinada ao Consumo Humano no Estado de São Paulo, instituído em 2014 (BRASIL, 2014), em função da crise hídrica e considerando a necessidade de trabalhar o Plano de Segurança da Água para mananciais críticos, resolveu estabelecer um plano de contingência para cianobactérias e cianotoxinas para a Represa Guarapiranga, a ser estendido para outros mananciais com problemas de florações de alga.

Para isso, a CETESB propôs para discussão no Comitê valores de alerta para cianotoxinas e quantidade de organismos potencialmente produtores dessas substâncias na água, sendo estabelecidos três níveis de alerta para saxitoxina e análogos em água destinada ao abastecimento público: médio ($0,13 \mu\text{g}$ equivalente STX.L⁻¹), alto ($0,6 \mu\text{g}$ equivalente STX.L⁻¹) e máximo ($3 \mu\text{g}$ equivalente STX.L⁻¹).

Para a obtenção dos valores supra citados, a CETESB utilizou o NOAEL proposto por Fitzgerald e colaboradores em 1999 (FITZGERALD et al., 1999), $2,06 \mu\text{g}$ de saxitoxina equivalente por Kg de peso corporal, ao qual, na ocasião, foi aplicado um fator de incerteza de 10 devido a utilização de LOAEL e não de NOAEL, resultado em um valor de $0,2 \mu\text{g}$ de equivalente STX por Kg de peso corporal. A esse valor ($0,2 \mu\text{g}$ de equivalente SXT.kg⁻¹), a CETESB aplicou um outro fator de incerteza de 10 para suprir lacunas de estudos crônicos, obtendo então a dose de referência aguda de $0,02 \mu\text{g}$ de equivalente STX por Kg de peso corporal.

A partir dessa dose de referência aguda (ARfD) de $0,02 \mu\text{g}$ de equivalente STX por Kg de peso corporal, foi realizado o cálculo do alerta médio em relação a um peso de 5 kg e ingestão de água equivalente a 0,75L, valores referentes à um bebê com menos de um ano de idade que se alimenta exclusivamente com fórmulas preparadas com água (WHO, 2017). O resultado desse cálculo ($0,13 \mu\text{g}$ de equivalente SXT.kg⁻¹) equivale a um valor que intenciona proteger crianças menores que 6 anos e grupos vulneráveis como mulheres grávidas, mães amamentando, indivíduos com disfunções hepáticas pré-existentes, indivíduos recebendo tratamento de diálise, idosos e populações suscetíveis.

Desse modo, o valor de alerta nível médio, proposto pela CETESB ($0,13 \mu\text{g}$ de equivalente SXT. kg^{-1}), é ainda mais restritivo que o proposto pelos estados americanos de Ohio e Oregon ($0,3 \mu\text{g}$ de equivalente SXT. kg^{-1}) e indica a possibilidade da ocorrência de efeito toxicológico agudo em grupos sensíveis que utilizem água do reservatório Itupararanga uma vez que os dados amostrais do monitoramento da CETESB foram superiores que o referido valor de alerta em aproximadamente 60% das amostragens. Tais fatos não consideraram a degradação dessa cianotoxina nem sua remoção durante o tratamento por falta de dados.

Outro fator importante a ser considerado é o fato das linhagens brasileiras estarem produzindo não apenas a saxitoxina como também seus análogos (MOLICA et al., 2002; RISSETI, 2012). Essa variação na produção dos análogos da saxitoxina apresentou distinções entre as cepas. No estudo de Lagos et al. (1999), a cepa proveniente da floração de um lago privado, em Amparo, produziu maior quantidade de neoSTX; já a cepa proveniente do reservatório Billings (braço Taquacetuba) apresentou produção de goniatoxinas (GTX2 e GTX3) que foram superiores às de saxitoxina (RISSETI, 2012). Fato inquietante, considerando que o kit utilizado na obtenção dos dados desse trabalho é 100% sensível para detecção de saxitoxina, mas sua sensibilidade para os análogos está abaixo de 30%, dessa forma poderia estar ocorrendo uma subestimação dos valores reais das toxinas na água. Por exemplo, para GTX 2 e 3 a sensibilidade cai a 23% e para neoSXT a queda é ainda maior, 1,3%.

Modelo conceitual de exposição para ingestão de água e Dose diária de ingestão com análise de sensibilidade

Considerando a elevada correlação de células de cianobactérias e concentrações de saxitoxina na água, a possibilidade de outro gênero também estar produzindo essa cianotoxina, a possibilidade de efeitos tóxicos agudos em pessoas sensíveis, quando se compara as concentrações de saxitoxina obtidas na água bruta do reservatório Itupararanga e o novo valor de alerta em discussão na CETESB para saxitoxina, a ineficiência do tratamento convencional para remoção da saxitoxina e variantes da água destinada ao abastecimento e ao fato dos valores obtidos para esse trabalho possivelmente estarem subestimados devido a sensibilidade do kit utilizado para análise ser 100% reativo à saxitoxina porém menos reativo para as variantes, propôs-se a construção de um modelo de exposição baseado em dados da literatura

e premissas já detalhados no item material e métodos. O cenário resultante é apresentado no quadro 8.

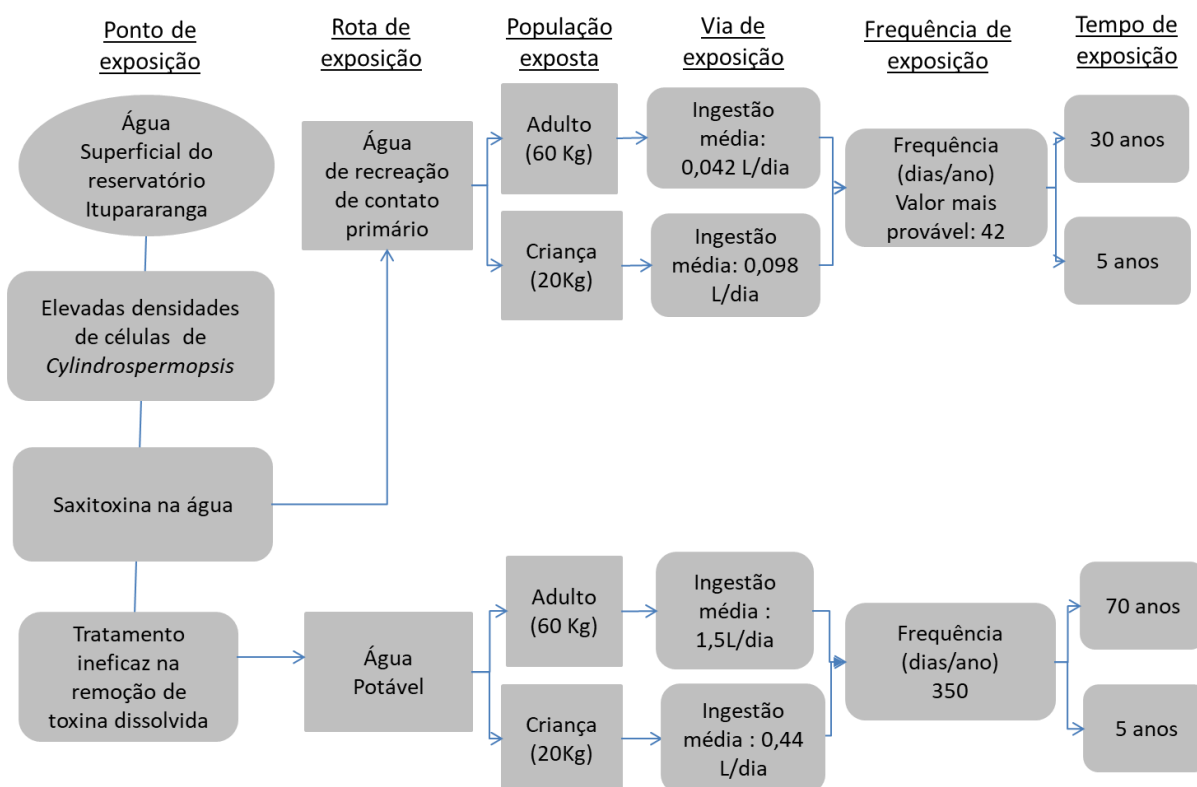
Quadro 8: Parâmetros utilizados no cenário de exposição à água, taxa de ingestão, frequência de exposição, duração da exposição e peso corporal assumido para crianças e adultos

Água potável destinada ao abastecimento público						
População exposta	Peso corpóreo (kg)	Taxa de ingestao (L.dia ⁻¹)	Frequência da exposição (dias/ano)			Duração da exposição (anos)
		Valor médio (desvio Padrão)	Valor de determinístico			Valor determinístico
Crianças	20 ⁽¹⁾	0,44 (0,92) ⁽³⁾	365 ⁽⁷⁾			5 ⁽⁷⁾
Adultos	60 ⁽²⁾	1,5 (0,80) ⁽³⁾	365 ⁽⁷⁾			70 ⁽⁴⁾
Água de recreação de contato primário						
População exposta	Peso corpóreo (kg)	Taxa de ingestão (L.dia ⁻¹)	Frequência da exposição (dias/ano)			Duração da exposição (anos)
		Valor médio	Distribuição Triangular			Valor determinístico
			Mínimo	Máximo	Mais provável	
Crianças	20 ⁽¹⁾	0,098 ⁽⁵⁾	6 ⁽⁶⁾	115 ⁽⁷⁾	42 ⁽⁷⁾	5 ⁽⁷⁾
Adultos	60 ⁽²⁾	0,042 ⁽⁵⁾	6 ⁽⁶⁾	115 ⁽⁷⁾	42 ⁽⁷⁾	30 ⁽⁷⁾

Legenda: (1) Farrer et al.,2015; (2) WHO, 2017; (3) Sato et al. (2013); (4) Gerba et al., 2000; (5) Dufour et al., 2006; (6) Pinto, 2016; (7) assumidos no âmbito desse trabalho.

Com base no cenário proposto no quadro 8, foi elaborado o modelo conceitual (Figura 12) de exposição à saxitoxina no reservatório Itupararanga, referente às elevadas densidades de células de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis*, considerando como exposição a ingestão de água potável e ingestão acidental de água durante atividade de recreação de contato primário.

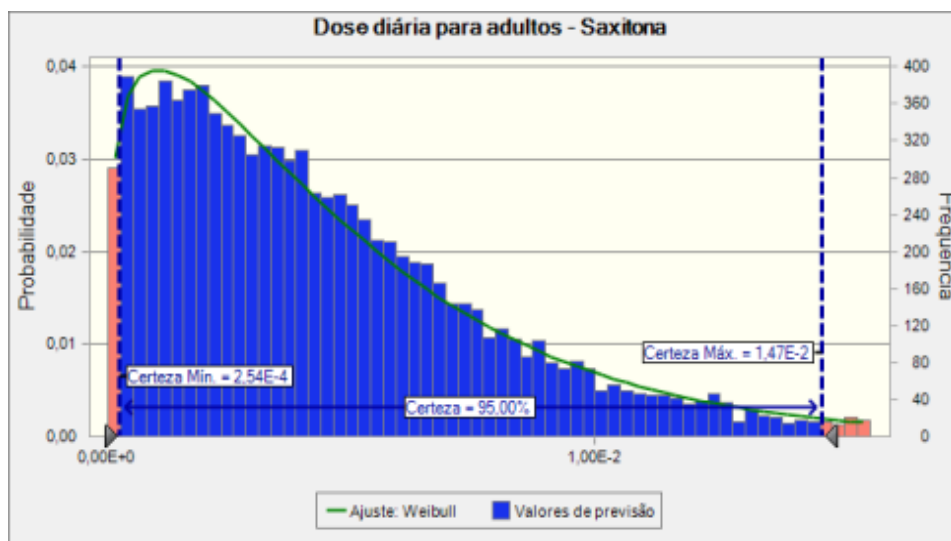
Figura 12 - Modelo conceitual de exposição à saxitoxina no reservatório Itupararanga, referente as elevadas densidades de células de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis*, considerando as exposições referentes a ingestão de água potável e ingestão acidental de água durante atividade de recreação de contato primário.



Baseado no modelo e no cenário de exposição propostos obteve-se os valores médio, medianas e intervalos de 5% a 95% de confiança, referentes aos valores da ingestão diária crônica (IDC) de saxitoxina para ambas as exposições, ingestão de água potável e ingestão acidental de água durante atividade de recreação de contato primário, para crianças e adultos (figuras 13, 14, 15 e 16).

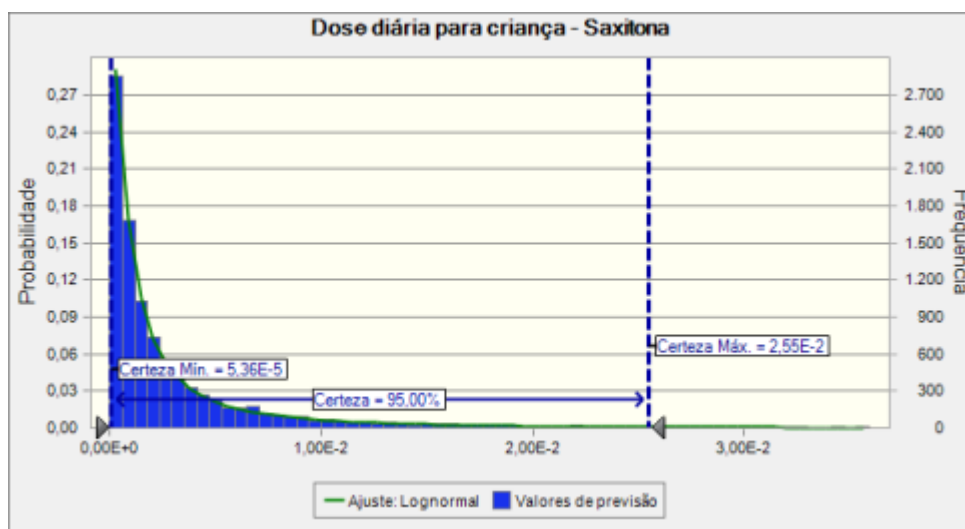
Para ingestão diária crônica de saxitoxina em água potável em relação à exposição de adultos os valores obtidos foram: média de $4,66 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$; mediana de $3,75 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e intervalo de 5% a 95% de confiança de $2,5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ a $1,47 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Figura 13).

Figura 13 – Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água destinada ao consumo humano para adultos



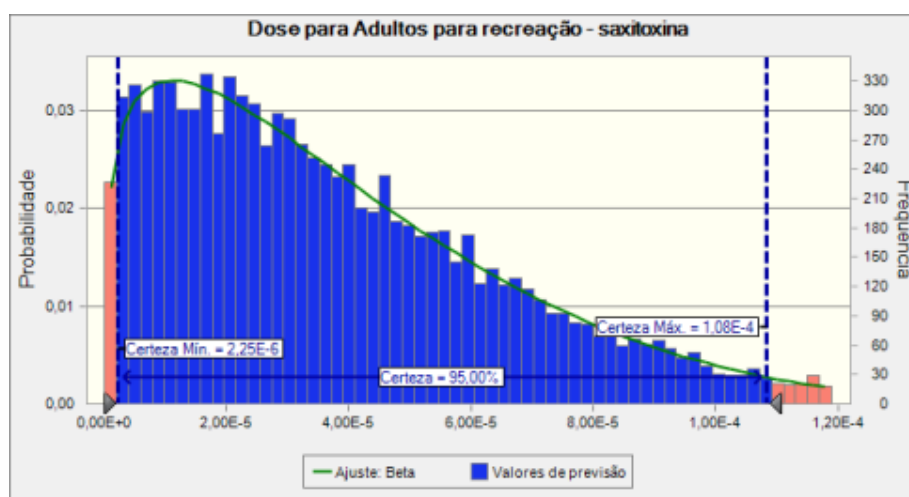
Ainda em relação à ingestão diária crônica de saxitoxina em água potável, mas em relação à exposição de crianças os valores obtidos foram: média de $4,18 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; mediana de $1,42 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e intervalo de 5% a 95% de confiança de $5,36 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a $2,55 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Figura 14).

Figura 14 – Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água destinada ao consumo humano para crianças



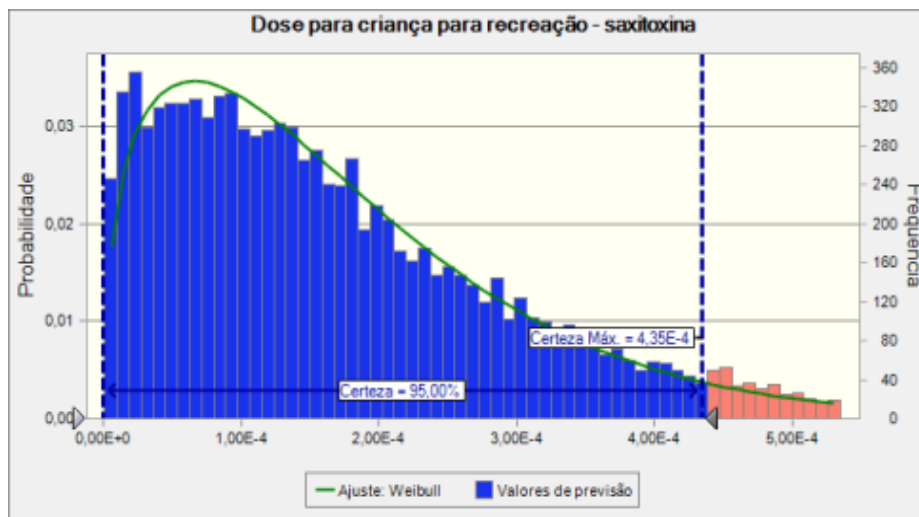
Para ingestão diária crônica de saxitoxina por meio de recreação de contato primário em relação à exposição de adultos os valores obtidos foram: média de $3,87 \times 10^{-5}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; mediana de $3,25 \times 10^{-5}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e intervalo de 5% a 95% de confiança de $2,55 \times 10^{-6}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a $1,08 \times 10^{-4}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Figura 15).

Figura 15 – Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água ingerida durante atividade de recreação de contato primário para adultos



Ainda em relação à ingestão diária crônica de saxitoxina por meio de recreação de contato primário, mas em relação à exposição de crianças os valores obtidos foram: média de $1,71 \times 10^{-4}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; mediana de $1,42 \times 10^{-4}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e intervalo de 5% a 95% de confiança de $2,78 \times 10^{-9}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a $4,35 \times 10^{-4}$ μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Figura 16).

Figura 16 – Distribuição dos valores de ingestão diária crônica de saxitoxina (μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) para água ingerida durante atividade de recreação de contato primário para crianças



De forma geral, os valores de ingestão diária crônica (IDC) de água potável foram superiores aos valores relacionados à ingestão acidental durante atividade de recreação de contato primário tanto para adultos quanto para crianças (quadro 9).

Quadro 9 – Valores de Ingestão diária crônica de saxitoxina em μg equivalente STX. $\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ em relação à água potável e água de recreação de contato primário para crianças e adultos

Dose - Água potável destinada ao abastecimento público (µg. equivalente STX.kg ⁻¹ .dia ⁻¹)					
População exposta	Cianotoxina	Média	Mediana	Percentis	
				5%	95%
Crianças	Saxitoxina	4,18 x 10 ⁻³	1,42 x 10 ⁻³	5,36 x 10 ⁻⁵	2,55 x 10 ⁻²
Adultos		4,66 x 10 ⁻³	3,75 x 10 ⁻³	2,54 x 10 ⁻⁴	1,47 x 10 ⁻²
Dose - Água de recreação de contato primário (µg. equivalente STX.kg ⁻¹ .dia ⁻¹)					
População exposta	Cianotoxina	Média	Mediana	Percentis	
				5%	95%
Crianças	Saxitoxina	1,71 x 10 ⁻⁴	1,42 x 10 ⁻⁴	2,78 x 10 ⁻⁹	4,35 x 10 ⁻⁴
Adultos		3,87 x 10 ⁻⁵	3,25 x 10 ⁻⁵	2,25 x 10 ⁻⁶	1,08 x 10 ⁻⁴

Em relação à água potável, principalmente os valores médios e medianos de ingestão foram muito semelhantes para crianças e adultos, indicando que a exposição similar entre os dois grupos. Já em relação à ingestão de água através de recreação de contato primário, os valores

de ingestão diária crônica de crianças foram superiores aos valores de ingestão dos adultos, indicando que a exposição das crianças é maior.

As duas formas de exposição evidenciam que as crianças estão submetidas a um nível de exposição mais crítico pois, no caso da exposição a água potável, estão submetidas a mesma ingestão da saxitoxina que os adultos e no cenário de exposição por recreação de contato primário, estão mais expostas por ingerirem mais saxitoxina. Tal situação é preocupante uma vez as crianças são mais sensíveis aos efeitos de substâncias tóxicas que os adultos em função de estarem em fase de desenvolvimento tanto em relação ao metabolismo como em relação as vias de excreção (ALVES et al., 2007).

Além disso, a possibilidade de ocorrência de danos cognitivos relacionados a memória e aprendizado (DIEHL et al., 2016) aliados a comprovação da capacidade da STX de atravessar a barreira hematoencefálica e se distribuir por todo o cérebro, apresentando maior concentração no hipotálamo e córtex frontal (CIANCA et al., 2007), ambos estudos realizados em ratos, aliado ao fato da STX possivelmente apresentar meia vida de menos de 10 horas em humanos (GESSNER, 1997) podem representar um risco neural ainda pobremente compreendido da exposição contínua e não letal da STX.

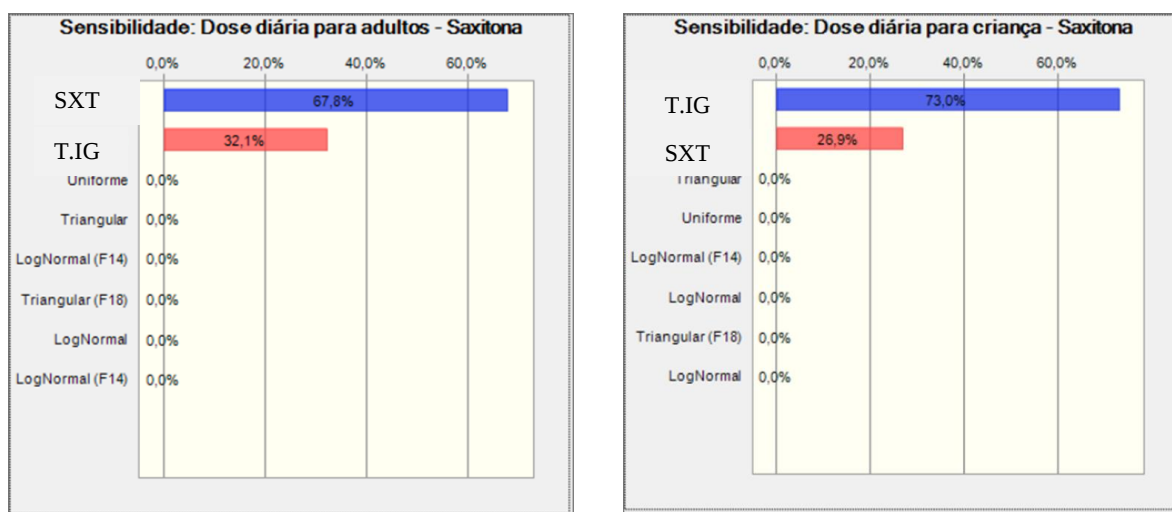
Tal risco foi evidenciado no estudo realizado O'Neill et al. (2017), com duas linhagens celulares neuronais modelo, PC12⁶ e SHSY5Y⁷, expostas por sete dias (tempo de exposição considerado crônico para esse tipo de linhagem celular) em concentrações de saxitoxina que variaram de 0,25 a 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (0.25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os resultados demostraram que houve efeito sobre o desenvolvimento neuronal normal das duas linhagens, com alterações morfológicas em relação aos filopódios, ao comprimento e à porcentagem de projeções dos axônios das células e com relação à fisiologia da célula, demonstrado pela distribuição do corante histoquímico F-actina. Tais alterações indicaram implicações funcionais para as células neuronais. Esse trabalho sugeriu que a ação das PSTs pode ser mais complexa do que se supunha e concluiu que a exposição a baixas doses poderia acarretar em implicações para o desenvolvimento do sistema nervoso como todo, sugerindo mais investigações com relação a exposição aos análogos dessa cianotoxina.

⁶ Células PC12: células de feocromocitoma de rato (SAKAGAMI et al. 2017). São usadas como modelo de células de neurônios periféricos do sistema nervoso autonômicos

⁷ Células SH-SY5Y células de neuroblastoma humanas (SAKAGAMI et al. 2017). São usadas como modelo de neurônios do sistema nervoso central.

Os cálculos dos valores de ingestão diária crônica (IDC) foram influenciados de maneiras distintas pelas variáveis inseridas de acordo com o cenário proposto, situação evidenciada pelas análises de sensibilidade (figuras 17 e 18).

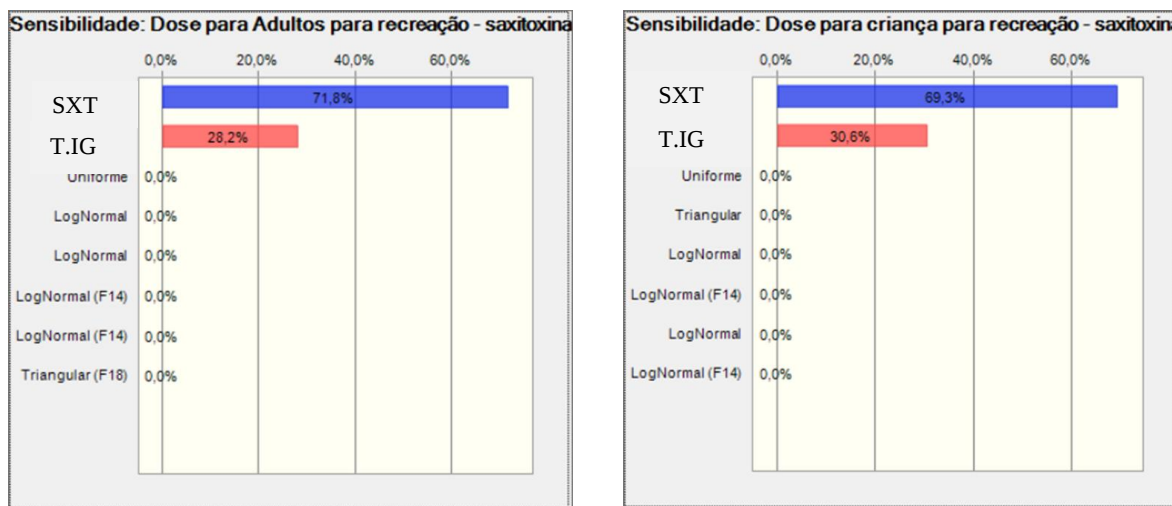
Figura 17 - Análise de sensibilidade do cálculo da ingestão diária crônica (IDC) relativa à ingestão água potável, para crianças e adultos



Legenda: SXT: Concentração de Saxitoxina; T. IG: Taxa de ingestão de água

Com relação à ingestão de água potável, as análises de sensibilidade evidenciaram que para crianças a taxa de ingestão foi a variável que mais interferiu no cálculo da dose de ingestão diária crônica, contribuindo com 73% do valor. Já para adultos foi a concentração da saxitoxina, provavelmente, isso ocorreu em função do desvio padrão em relação ao valor médio de ingestão para crianças ($0,92 \text{ L.dia}^{-1}$), ser maior que o próprio valor médio de ingestão ($0,44 \text{ L.dia}^{-1}$).

Figura 18 - Análise de sensibilidade do cálculo da ingestão diária crônica (IDC) relativa à ingestão accidental de água durante atividade de recreação de contato primário, para crianças e adultos



Legenda: SXT: Concentração de Saxitoxina; T. IG: Taxa de ingestão de água

Com relação à ingestão de água durante atividade de recreação de contato primário, a análise de sensibilidade evidenciou que a concentração de saxitoxina na água foi a mais importante para os dois grupos expostos, entretanto, para crianças, a contribuição da taxa de ingestão no cálculo de IDC foi superior a de adultos, pois as crianças ingerem mais água durante as atividades recreacionais que os adultos.

A ingestão diária crônica (IDC) é uma medida importante para caracterização da exposição. Entretanto, a literatura disponível é escassa quanto a discussões referentes à ingestão diária crônica de saxitoxina em cenários específicos. As informações comumente encontradas são referentes à Dose de Referência aguda ou à ingestão diária tolerável.

Os valores de IDC são utilizados nos processos de avaliação de risco, sendo imprescindível no cálculo do coeficiente de perigo (HQ - Hazard Quotient), risco não carcinogênico. O HQ é um valor de risco usado para avaliar um potencial tóxico não carcinogênico (NAFVAC 2013), sendo estimado através da relação entre a exposição (IDC) e o valor da dose de referência (RfD) (U.S.EPA, 2001). Os IDCs e RfDs devem ser expressos nas mesmas unidades e

representam o mesmo período de exposição (isto é, crônico, subcrônico ou curto prazo) (NAVFAC, 2013).

Um HQ com valor menor do que 1 indica que a dose da exposição de um único contaminante é inferior ao RfD e, desse modo, não são esperados efeitos tóxicos não cancerígenos (NAVFAC, 2013).

O risco não carcinogênico, representado pelo HQ, poderia ser calculado para a saxitoxina e suas variantes, que são capazes de induzir a severos danos toxicológicos (GESSNER et al., 1997; FITZGERALD et al., 1999; HUMPAGE et al., 2000; HARDY, 2011; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014, U.S. EPA, 2015). Entretanto, devido ao fato da dose de referência da saxitoxina ser baseada em estudos toxicológicos agudos, não foi possível estimar o coeficiente de risco. Tal fato impossibilita extrair uma conclusão apropriada sobre as ingestões diárias crônicas calculadas para o modelo proposto, se podem ser consideradas elevadas ou adequadas em relação a saúde da população exposta.

Para completar o estudo de exposição foi realizada uma busca por informações referentes a estimativa do risco carcinogênico, uma vez que ele poderia ser aplicado saxitoxina devido á evidências de que a exposição à essa cianotoxina induz a formação de micronúcleos em ensaios realizados com o peixe marinho da espécie *Diplodus sargus* (COSTA et al., 2012).

Entretanto, não foi possível aplicá-lo em virtude da falta do valor do Fator de carcinogenicidade (*Slope Factor*). Esse valor indica o incremento de risco de câncer de uma dose de 1 mg de substância por quilograma de peso corporal por dia, durante o seu tempo de vida. Provavelmente, o referido fator não foi calculado devido ao fato dos dados existentes serem inadequados e/ou insuficientes para o propósito uma vez que foram visitados os principais sítios eletrônicos⁸ relacionados a agentes ambientais e a câncer e não foram encontrados dados sobre essas cianotoxinas.

⁸ IRIS - Integrated Risk Information System

(<<https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?keyword=Cylindrospermopsin>> (<https://www.epa.gov/iris>> Acesso em 09.09.17) e IARC – International Agency for Research on Cancer (<<http://www.iarc.fr/>> Acesso em 09.09.17)

6. CONCLUSÃO

A qualidade da água do reservatório Itupararanga se encontra comprometida em função das elevadas densidades de células de cianobactérias, principalmente do gênero *Cylindrospermopsis*, e de concentrações quantificáveis de saxitoxina e análogos na água bruta.

As concentrações, dessa cianotoxina, encontradas no monitoramento de água bruta realizado pela CETESB atendem ao valor especificado na legislação brasileira para a água potável. Assim, mesmo considerando a hipótese de que não haveria remoção da saxitoxina e análogos durante o tratamento convencional, a água utilizada para abastecimento atende ao padrão de potabilidade para esta cianotoxina. Porém, quando essas concentrações são comparadas com os valores de alerta de Ohio e Oregon nos Estados Unidos e com os novos valores de alerta em discussão no Comitê Permanente para Gestão Integrada da Qualidade da Água destinada ao Consumo Humano no Estado de São Paulo, há evidência de possibilidade de ocorrência de efeitos adversos à saúde em populações sensíveis como crianças menores que 6 anos, mulheres grávidas, mães amamentando e indivíduos com disfunções hepáticas pré-existentes. Nesse caso a eficiência do tratamento na remoção das cianotoxinas torna-se uma questão crítica para as populações sensíveis.

Além disso, o cálculo da ingestão diária crônica de saxitoxina e análogos, provenientes de consumo de água contaminada com esta cianotoxina, baseada no cenário de exposição proposto neste trabalho, permitiu inferir que as crianças estão submetidas a um nível de exposição mais crítico quando comparadas a adultos. Esta situação é tanto mais preocupante considerando o fato das crianças serem mais sensíveis aos efeitos de substâncias tóxicas que os adultos, em função de estarem em fase de desenvolvimento, e de estudos demonstrarem que a saxitoxina administrada com injeções intraperitoneais foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica em ratos, que houve diminuição de aprendizado em ratos que consumiram água com saxitoxina, ou ainda alteração em culturas de células neurais expostas à saxitoxina. Os efeitos crônicos da exposição contínua e subletal da saxitoxina e análogos em humanos, em relação aos seus possíveis efeitos, ainda são desconhecidos, mas infere-se que sua interferência seja mais crítica no período fetal e da infância.

Diante dessa situação, a construção de um modelo conceitual de exposição à saxitoxina e análogos, considerando a ingestão de água durante atividades de recreação de contato primário e ingestão de água potável, norteados por um cenário de exposição elaborado para o reservatório Itupararanga, foi um avanço na identificação de lacunas de informações referentes à exposição da população, principalmente em países tropicais, onde as pessoas estão expostas de maneira mais frequente, quando comparadas a países situados em regiões temperadas. Nestas últimas, foca-se no consumo de organismos de origem marinha e seus efeitos agudos. Assim, foi identificada a necessidade da realização de mais estudos relativos aos efeitos crônicos da exposição à saxitoxina, bem como análises probabilísticas para derivação de doses de referências adequadas para avaliação de impacto na saúde de expostos a essa cianotoxina, além da obtenção do valor de fator de carcinogenicidade (*Slope Factor*) para que seja possível estimar os riscos carcinogênicos.

7 REFERÊNCIAS

ÁGUAS DE VOTORANTIM. Estação de tratamento de água [2017?]. Disponível em: <<https://grupoaguasdobrasil.com.br/aguas-votorantim/agua-e-esgoto/estacao-tratamento-agua/>> Acesso em: 30 jul. 2018.

ALVES, C. et al. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v.23, n.5 p. 1005-1014, 2007.

AMARAL, V. et al. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. **European Journal of Phycology**. 2014.

AMORIM, F. F. **Remoção dos contaminantes orgânicos β -estradiol e saxitoxinas (STX, Neo-STX e dc-STX) por meio de nanofiltração: avaliação em escala de bancada**. Dissertação de mestrado. Brasília. 2007.

APHA; AWWA; WEF. Method 10200 Plankton, Phytoplankton A-B, C1, E-F. In: **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2006. Approved by SM Committee 2011. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/applications/UserCenter/DownloadFile.cfm?ProductID=522>>. Acesso em: fev. 2014.

BALLOT, A. et al. Paralytic Shellfish Poisoning Toxin-Producing Cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n.4, p. 1173–1180, 2010.

BERNARD, C. et al. Toxicological Comparison of Diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains: Evidence of Liver Damage Caused by a French *C. raciborskii* Strain. **Wiley Periodicals**. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740803>> Acesso em: fev. 2017.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. do C. et al. Cylindrospermopsin in Water Supply Reservoirs in Brazil Determined by Immunochemical and Molecular Methods. **Journal of Water Resource and Protection**, n. 3, p.349-355, 2011.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. do C. et al. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 1, n. 86, p. 297-309, 2014.

BOTANA L. M. et al. The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, 2010.

BUCH, B. **Ecofisiologia de morfotipos reto e espiralado de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) em condições Controladas**. 2009. 41 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87891>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 março 2005. Seção 1, n. 53, p. 58-63.

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de janeiro de 2001. Seção 1, n. 18, p. 70-71.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria de Consolidação nº 5, de 03 de outubro de 2017. Dispõe sobre a consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, nº 190, p. 360.

BRASIL. Resolução Conjunta SMA/SSRH Nº 4, de 23 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a regulamentação das excepcionalidades para aplicação de algicidas nos corpos de água superficiais no Estado de São Paulo e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, nº 122, p. 63.

BRASIL. Resolução Conjunta SES/SMA/SSRH-01, de 20 de fevereiro de 2014. Institui Comitê Permanente para Gestão Integrada da Qualidade da Água destinada ao Consumo Humano no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 52.

BRANDÃO, C. C. S.; AMORIM, F. F. Removal of the organic contaminants β -estradiol e saxitoxina (STX, neo-STX e Dc-stx) por nanofiltração: Bench scale evaluation. **Procedia Engineering**, v. 44, p. 209-212, 2012.

BRANDÃO, C.J., COELHO-BOTELHO, M.J., SATO, M.I.Z., LAMPARELLI, M.C. (Org.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. ISBN: 978-85-89629-83-6. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, p. 325 2011. Disponível em: <<http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/guia-nacional-coleta-2012.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2016.

BONILLA, S. et al. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? Federation of European Microbiological Societies (FEMS). **Microbiology Ecology** n.79, p.594–607, 2012.

CARNEIRO, R. L. et al. Growth and Saxitoxin Production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Correlate with Water Hardness. **Marine Drugs**, v.11, p. 2949-2963, 2013.

CARVALHO, M.C. et al. **Manual de cianobactérias planctônicas: Legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais**. São Paulo: CETESB. 2013.

CIANCA, R.C. et al. Application of precolumn oxidation HPLC method with fluorescence detection to evaluate saxitoxin levels in discrete brain regions of rats. **Toxicon**, v.49, n.1, p. 89–99, 2007.

CETESB. **L5.303. Fitoplâncton de água doce: Métodos qualitativo e quantitativo**. 4^a Edição. 2012.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2015**. São Paulo 2016. (Série Relatórios). Disponível em: < http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasSuperficiais2015_ParteI_25-07.pdf>. Acesso em: 18 març. 2018.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016**. São Paulo 2017. (Série Relatórios). Disponível em: < http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasInteriores_2017_02-06_VF.pdf>. Acesso em: 18 març. 2018.

CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: **The Water Environmental, Algal, Toxins and Health** (ed. W. W. Carmichael), p. 161-172. New York. 1981.

CHISWELL, R.K. et al. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. **Environmental Toxicology**. v.14, p.155-161, 1999.

CHONG, M.W.K. et al. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. **Toxicon**, n.40, p.205–211, 2002.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon; 1999.

CHORUS, I. **Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.** 2012.

CHURRO, C. et al. **Risk Assessment of Cyanobacteria and Cyanotoxins, the Particularities and Challenges of *Planktothrix* spp. Monitoring.** In: Novel Approaches and Their Applications in Risk Assessment, Editora Dr. Yuzhou Luo. p.59-84, 2012.

CODD, G.A. et al. **CYANONET: A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management Initial Situation Assessment and Recommendations.** International Hydrological Programme. **UNESCO.** 2005.

COX, P.A. et al. S.J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 100. p. 13380-13383. 2003.

COSTA, P.R. et al. Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. **Aquatic Toxicology**, v. 106-107, p. 42-47, 2012.

DI BERNARDO, L. et al. **Florações de Algas e de Cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento.** São Carlos, 2010.

DIEHL et al. Behavioral alterations induced by repeated saxitoxin exposure in drinking water. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, 2016.

DUFOUR, A. et al. CANTÚ, R. Water ingestion during swimming activities in a pool: A pilot study. **Journal of Water and Health**, v.4, n. 4, p. 425-430, 2006.

DURIGAN, M. A. B. et al. Degradação de poluentes emergentes por processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1381-1387, 2012

EPA. OEHHA. **Toxicological summary and suggested action levels to reduce potential adverse health effects of six cyanotoxins:** draft final report. Califórnia, 2009. Disponível em:

<http://www.swrcb.ca.gov/water_issues/programs/peer_review/docs/calif_cyanotoxins/draft_cyanotoxinseport_oeha.pdf>. Acesso em: 12 out. 2016.

EPA, OEHHA. **Toxicological summary and suggested action levels to reduce potential adverse health effects of six cyanotoxins**: draft final report. Califórnia, 2012. Disponível em:

<http://www.swrcb.ca.gov/water_issues/programs/peer_review/docs/calif_cyanotoxins/cyanotoxins053112.pdf>. Acesso em: 15 set. 2017.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Saxitoxin Group. **The EFSA Journal** 1019, 1-76. 2009a

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. **The EFSA Journal** 1306, 1-23. 2009b

FAASSEN, E. J. Presence of the Neurotoxin BMAA in Aquatic Ecosystems: What Do We Really Know? **Toxins**, n. 6, p.1109-1138, 2014.

FALCONER, I. R. **Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsin and microcystins**. CRC press. Florida. 2005.

FARRER, D. et al. Health-Based Cyanotoxin Guideline Values Allow for Cyanotoxin-Based Monitoring and Efficient Public Health Response to Cyanobacterial Blooms. **Toxins**, v.7, p.457-477, 2015.

FERNANDEZ, D. A. et al. Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin. **Toxicon**, v.91, p. 23 - 34, 2014.

FITZGERALD, D. J. et al. Development of Health Alerts for Cyanobacteria and Related Toxins in Drinking Water in South Australia. **Environmental Toxicology**, p. 203-209, 1999.

FONSECA, M. T. et al. Efeito do exercício físico sobre o volume nasal. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 256-60, 2006.

FRASCARELI, D. et al. Heterogeneidade espacial e temporal de variáveis limnológicas no Reservatório de Itupararanga associadas com o uso do solo na Bacia do Alto Sorocaba-SP. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 4, Taubaté, 2015.

FREITAS, C. M. de. Avaliação de Riscos como Ferramenta para a Vigilância Ambiental em Saúde. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.11 p: 227 – 239, 2002.

FREITAS, S. M. **Remoção de microcistina e saxitoxina por meio de oxidação por hipoclorito de sódio: avaliação em escala de bancada**. 2007. 106f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Universidade de Brasília, DF, 2007. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9966/1/2007_MarianaSousaFreitas.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2018.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v.38, p.97–125. 2008.

GEHRINGER M. M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.557, p. 1-8, 2004.

GEMMA, S. et al. Lipopolysaccharides in Cyanobacteria: A Brief Overview. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 391-397, 2016.

GERBA, C.P. Risk Assessment. In: MAIER R.M, PEPPER I.L. GERBA C.P. (ed) **Environmental Microbiology**. San Diego, 2000.

GESSNER, B.D. et al. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. **Toxicon** v.35, p. 711–722, 1997.

GIANNUZZI, L. et al. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. **Marine Drugs**, v. 9, p.2164-2175, 2011.

GOOGLE EARTH ([2017?]). Reservatório Itupararanga. Disponível em: <<https://earth.google.com/web/@-23.62722977,-47.33482758,882.66328915a,20243.97686222d,35y,0h,0t,0r>>. Acesso em: 31.07.18

GOOGLE EARTH (2017). Reservatório Clemente. Disponível em: <<https://earth.google.com/web/@-23.60529394,-47.40194341,812.42201221a,3375.59892105d,35y,-0h,0t,0r>>. Acesso em: 31.07.18

HALLEGRAEFF, G.M. et al. Manual on Harmful Marine Microalgae. **UNESCO**, 2004.

HARDY, J. **Washington State Provisional Recreational Guidance for Cyindrospermopsin and Saxitoxin**: final report. Olympia. Washington State Department of Health. 2011. Disponível em: <<http://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/4400/332-118-cylicylindroSax%20Report.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2016.

HAWKINS, P.R. et al. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrosoermopsis raciborskii* (Wolszynka) Seeneya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.

HAWKINS, P. R. et al. I. R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 341-346, 1997.

HELLER, L.; PÁDUA, V. L. (Org.) **Abastecimento de água para consumo humano**. Editora UFMG. Belo Horizonte. 2006.

HILBORN, E. D. et al. Algal Bloom- Associated Disease Outbreaks Among Users of Freshwater Lakes – United State, 2009 – 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 63, n. 1, 2014.

HILBORN, E. D.; BEASLEY, V. R. One Health and Cyanobacteria in Freshwater Systems: Animal Illnesses and Deaths Are Sentinel Events for Human Health Risks. **Toxins**, n. 7, p. 1374-1395, 2015.

HORWITZ, W. Paralytic shellfish poison. Biological method (32) - official final action. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 13^a Edition, p. 298. Washington D.C. 1980. In: LLEWELLYN, L.E; ENDEAN, R. Toxins extracted from Australian specimens of the crab, *Eriphia sebana* (Xanthidae). **Toxicon**, v. 27, n. 5, p. 579-86. 1989.

HUMPAGE, A.R. et al. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 472, p. 155–161. 2000.

HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I.R. Oral Toxicity of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Male Swiss Albino Mice: Determination of No Observed Adverse Effect Level for Deriving a Drinking Water Guideline Value. **Environmental Toxicology**, n.8, p. 94–103, 2003.

INDRASENA, W.M., GILL, T.A. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins. **Food Chemistry**, v. 71, p. 71-77, 2000.

IBIUNA. **Prainha do Escritório**. Matéria publicada em 23/11/2011 as 12:35, e arquivado em Turismo. Disponível em: <<http://www.ibiuna.com.br/turismo/prainha-do-escritorio>>. Acesso em: 28/07/2018.

JIANG, L. et al. Quantification of neurotoxin BMAA (b-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. **Scientific Reports**. 2014.

JONES, G.J.; A., P NEGRI. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. **Water Research**. v.31, n. 3, p. 525–533. 1997.

KAHN, H.D., STRALKA, K. Estimated daily average per capita water ingestion by child and adult age categories based on USDA's 1994-1996 and 1998 continuing survey of food intakes by individuals. **Journal Exposure Science and Environmental Epidemiology**. n.19, p. 396-404, 2009.

KAO, P. N. et al. The active guanidinium group of saxitoxin and neosaxitoxin identified by the effects of pH on their activities on squid axon. **Pflügers Archiv. European Journal of Physiology**, v. 398 p.199- 203, 1983.

KAO, C.Y. **Paralytic shellfish poisoning**. In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water; Falconer, I.R., Ed.; Academic Press: London, UK, p. 75–86, 1993.

KINNEAR, S. Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. **Maine Drugs**, v.8, p. 542-564, 2010.

KLING, H. J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria): A brief historic overview and recent discovery in the Assiniboine River (Canada). **Fottea**. v.9, n.1, p. 45–47, 2009.

KLITZKE, S., FASTNER, J. Cylindrospermopsin degradation in sediments e the role of temperature, redox conditions and dissolved organic carbon. **Water Research**, v.46, p. 1549-1555, 2012.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4: Nostocales. **Algological Studies** n.56 p.247-345. 1989.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales.** In Süßwasserflora von Mitteleurop (H.Ettl, G.Gärtner, H.Heynig & D.Möllenbauer eds.). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. vol.19/1. 548 p., 1998.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales.** In Süßwasserflora von Mitteleuropa (B. Büdel G. Gärtner, L. Krientitz & M. Schagerl eds.). ELSEVIER Spektrum Akademischer Verlag München. vol. 19/2. 759 p., 2005.

KOMÁREK, J. **Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera.** In Süßwasserflora von Mitteleuropa. Freshwater Flora of Central Europe. (B. Büdel G. Gärtner, L. Krientitz & M. Schagerl eds.). Springer Spektrum Verlag Berlin Heidelberg. vol. 19/3. 1130 p., 2013.

KOMÁREK, J. et al., J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**. v. 86, p. 295-335. 2014.

KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; CRONBERG, G. Planktic blue-green algae from lakes in South Scania, Sweden. Part I. Chroococcales. **Algological Studies** n.72, p.13-51, 1994.

KURMAYER R, CHRISTIANSEN G. The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. **Freshwater Reviews**. v.2, p.31–50, 2009.

LLEWELLYN, L.E. et al. Postmortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. **Toxicon**, v.40, n.10, p. 1463-1469, 2002.

LAGOS, N. et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v.37, p. 1359–1373, 1999.

LOPES, F.W.de A. et al. Balneabilidade em águas doces no Brasil: riscos a saúde, limitações metodológicas e operacionais. **Hygeia**, v.9. n.16, p.28 - 47, jun. 2013.

LOPES, J. C. G. **Administração transmucosal: estratégias tecnológicas para a administração de fármacos.** Tese de mestrado. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde Porto, 2014.

MACAGNO, A. et al. A cyanobacterial LSP antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 6, p. 1481-1492. 2006.

MAGALHÃES, N. F. S. **Quantificação de cianotoxina por HPLC/MS² em amostras de água natural e urina humana.** Tese de mestrado. Faculdade de medicina da Universidade do Porto. 2015.

MANTHOS, P. et al. First report of a microcystin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii* strain isolated from Greece. The 10th International Conference on Toxic Cyanobacteria. 2010.

MARTINELLI, M. J. et al. The Azomethine Imine Route to Guanidines. Total Synthesis of (+)-Saxitoxin **Croatica Chemica Acta**, v. 59, n.1, p. 267-295, 1986.

MASTEN, S. Cylindrospermopsin Review of toxicological literature. 2000. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/cylindrospermopsin_508.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2017.

McDERMOTT, C. M. et al. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon**, Elmsford, v.36, n.12, p.1981-1996, 1998.

McGREGOR, G. B.; FABBRO, L.D. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, n 5, p. 195–205, 2000.

MELLO, M. e M et al. Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of Plankton Research**, v. 34, n.11, p. 987-994, 2012.

MEREL, S. et al. Characterization of cylindrospermopsin chlorination. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3433–3442, 2010.

MEREL, S. et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, v. 59, p. 303-327. 2013.

METCALF, J.S.; CODD, G.A. Analysis of cyanobacterial toxin by immunological methods. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.16. n. 2, p. 103-112, 2003.

MOHAMED, Z. A. et al. Occurrence of cyanobacteria and microcystin toxins in raw and treated waters of the Nile River, Egypt: implication for water treatment and human health.

Environmental Science and Pollution Research. DOI 10.1007/s11356-015-4420-z.
Published online: 10 April 2015.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

MOLICA, M. et al. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Pycology**, v.41, n. 6, p. 606-611, 2002.

MOORE, R.E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, 134-143, 1996.

MOORE, D. et al. Morphological changes during akinete germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (nostocales, cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 40, p 1098-1105, 2004.

MURCH S.J. et al. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.101 n.33, p. 12228-12231, 2004.

NAVFAC. **Solvent release area former naval air station south Weymouth**, Weymouth, Massachusetts. September 2013. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/region1/superfund/sites/sweymouth/548404.pdf>> Acesso em: 10 jan.2018.

NHMRC, NRMMC (National Health and Medical Research Council, Natural Resource Management Ministerial Council). Australian Drinking Water Guidelines Paper 6. Australian Government. Canberra. 2011. Version 3.2 (updated, 2016). Disponível em: <https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/file/publications/nhmrc_adwg_6_february_2016.pdf>. Acesso em: 16 out. 2016.

NHMRC (National Health and Medical Research Council). Guidelines for Managing Risks in Recreational Water. Australian Government Publishing Service. Canberra, 2008. Disponível em: <https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh38.pdf>. Acesso em: 12 out. 2016.

NICHOLSON, B.C. et al. Chlorination for degrading saxitoxins (paralytic shellfish poisons) in water. **Environmental Technology**, v. 24, n. 11, p. 1341-1348, 2003.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 400-408, 2007.

NORRIS, R. L.G. et al. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, v.14, n.1, p. 163–165, 1999.

NORRIS, R. L. G. et al. Distribution of ^{14}C Cylindrospermopsin in vivo in the Mouse. **Environmental Toxicology**. v. 16, n.6 p: 498-505, 2001.

OBEREMM, A. et al. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. **Environmental Toxicology**. v.14, p.107–115, 1999.

OHIO STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Public Water System Harmful Algal Bloom Response Strategy. 2013. Disponível em: <file:///F:/PARTICULAR/FSP/ARTIGOS/OHIO/2013_Public%20Water%20sistem.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2017.

OHIO STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Public Water System Harmful Algal Bloom Response Strategy**. 2017. Disponível em: <http://epa.ohio.gov/Portals/28/documents/habs/2017_PWS_HAB_Response_Strategy_5-15-17-FINAL.pdf>. Acesso em: 07 mai. 2018.

OHIO STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES. **Harmful Algal Bloom Response Strategy for Recreational Waters**. 2016. Disponível em: <http://epa.ohio.gov/portals/35/hab/HABResponseStrategy.pdf>. Acesso em: 07 mai. 2018.

OHTANI, I. et al. Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**. v.114, p.7941-7942, 1992.

O'NEILL, K. et al. Extended Low-Dose Exposure to Saxitoxin Inhibits Neurite Outgrowth in Model Neuronal Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.120, p. 390 – 397, 2017.

ONODERA, H. et al. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. **Natural Toxins**, v.5, p. 146–151, 1997.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS DO BRASIL – ONUBR. Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. Traduzido pelo Centro de

Informação das Nações Unidas para o Brasil (UNIC Rio), última edição em 13 de outubro de 2015. Disponível em: < <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/> >. Acesso em: 28 jul. 2018.

OTAÑO, S.; BOGARÍN, C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria, Nostocales) productora de microcistinas en Corrientes, Argentina. **Acta toxicológica argentina**, breve comunicação, vol. 22, n.3, 2014. Versão on-line ISSN 1851-3743.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv für Hydrobiologie – supplements**, n.107 p. 563-593. 1997. Disponível em: <<http://real.mtak.hu/3229/1/1014071.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016.

PAERL, H. W.; VALERIE, J. P. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, n 46, p.1349 - 1363. 2012. Disponível em: < http://www.tropicalsoybean.com/sites/default/files/Climate%20Change%20-%20Links%20To%20Global%20Expansion%20Of%20Harmful%20Cyanobacteria_Paerl%20%26%20Paul_2012.pdf >. Acesso em: 20 out. 2016.

PAUSTENBACH, J. D. Exposure Assessment. In: PAUSTENBACH, J. D. (Ed.) **Human and Ecological Risk Assessment – Theory and Practice**. Wiley-Interscience. A John Wiley & Sons, Inc. New York. 2002.

PEARSON, L. A. et al. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. **Harmful Algae**. v. 54, p. 98–111, 2016.

PEDRAZZI, F. J. de M. et. al. Avaliação da qualidade da água no reservatório de Ituparanga, Bacia do Alto Sorocaba (SP). **Geociências**, v. 33, n. 1, p.26-38, 2014.

PICCINI, C. et al. Revealing Toxin Signatures in Cyanobacteria: Report of Genes Involved in Cylindrospermopsin Synthesis from Saxitoxin-Producing *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Advances in Microbiology**, n. 3, p. 289-296, 2013.

PIERANGELINI, M. et al. Constitutive Cylindrospermopsin Pool Size in *Cylindrospermopsis raciborskii* under Different Light and CO₂ Partial Pressure Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n.9, p. 3069 –3076, 2015.

PINTO, K C. Estimativa de risco de infecção por *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp pela ingestão de água durante atividades de recreação de contato primário. Tese de doutorado. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo. 2016.

POMATI, F. et al. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 553–562, 2000.

PREUßEL, K. et al. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. **Harmful Algae**, v. 8, p. 645 – 650, 2009.

REISNER, M. et al. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. **Toxicological Sciences**, v.82, n.2, p. 620-627, 2004.

RISSETI, C. H. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. Tese de doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

ROSÉN, J.; HELLENÄS, K-E. Determination of the neurotoxin BMAA (b-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). **Analyst**, v.133, p.1785–1789, 2008.

RUNNEGAR, M.T. et al. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**. v. 49, n. 2, p. 219-225, 1995.

SAAE. Sistema Autônomo de Água e Esgoto (Sorocaba). Mananciais, [2018?]a Disponível em: <<http://www.saaesorocaba.com.br/agua/>>. Acesso em: 28 jul. 2018.

SAAE. Sistema Autônomo de Água e Esgoto (Sorocaba). Tratamento, [2018?]b Disponível em: <<http://www.saaesorocaba.com.br/agua/>>. Acesso em: 28 jul. 2018.

SANGOLKAR, L. N. et al. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. **Water Research**, v.40, p:3485-3496, 2006.

SANT’ANNA, C. L. et al. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Editora Interciência. Sociedade Brasileira de Ficologia. Rio de Janeiro, 2006.

SANT’ANNA, C. L. et al. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, n.1, p.1-17, jan.-mar. 2007.

SCARDALA, E. T. S. et al. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. **Critical reviews in toxicology**. v. 46, n.5, p.385-419, 2016.

SCHAKER, P. D. C. **Análise genômica de isolados brasileiros de *Cylindrospermopsis raciborskii* com enfoque em cilindrospermopsina e fixação biológica de N₂**. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2012.

SAKER, M. L. et al. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. **Journal of Phycology**. v.35, p.599–606, 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/279561601_Two_morphological_forms_of_Cylindrospermopsis_raciborskii_Cyanobacteria_isolated_from_Solomon_Dam_Palm_Island_Queensland?el=1_x_8&enrichId=rgreq-849688d4794aacb345be9539c5ac79ab-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzQzNDQ3ODk2O0FTOjEwMjM5OTkwMTQzNzk2OEAxNDExNDQ4MDIw> Acesso em: 05 mai. 2018.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**. v. 39, n.4, p: 349-354. 2000.

SATO, M. I. Z. et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment** n. 442, p. 389 – 396, 2013.

SANEAQUA. **Relatório de qualidade anual de água. 2016**. Mairinque, [2017?]. Disponível em: <https://www.saneaqua.com.br/wp-content/uploads/2014/01/Relat%C3%B3rio-Anual-de-Qualidade-de-%C3%81gua-Saneaqua_digital.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2018.

SAKAGAMI, H. et al. Re-evaluation of Culture Condition of PC12 and SH-SY5Y Cells Based on Growth Rate and Amino Acid Consumption. **in vivo**, v. 31, p. 1089-1095, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5756636/pdf/in_vivo-31-1089.pdf> Acesso em: 04 ago. 2018.

SHI, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. **Cell**. n. 139, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867409012549>> Acesso em: 17 mar. 2018.

SINHA, R. et al. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones. Is climate change responsible? **Water Research** n. 46, p.1408-1409. 2012.

STEWART, I. et al. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. **Environmental Health: A Global Access Science Source** 5:7. 2006a.

STEWART, I. et al. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. **BMC Dermatology**. 2006b.

STUCKEN, K. et al. Impact of Nitrogen Sources on Gene Expression and Toxin Production in the Diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and Non-Diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. **Toxins**. n. 6, p: 1896-1915, 2014.

SU. Z.; et al. Saxitoxin Blocks L-Type *Ica*. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 308, n.1, 2004.

TENNANT, A. D. et al. An outbreak of paralytic shellfish poisoning. *Canad. M A.J.* v.72, 1995.

TANIWAKI R. H. **A comunidade perifítica e suas relações com a qualidade da água no reservatório de Itupararanga (SP, BRASIL)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Sorocaba 2012.

TOROKNE, A. et al. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria: Experimental evidence. **Environmental Toxicology**. v.16 p.512–516, 2001.

TRIPADVISOR LLC. **Represa de Itupararanga**. Needham, MA, [2016?]. Disponível em: < https://www.tripadvisor.com.br/ShowUserReviews-g2344174-d2372955-r552337010-Itupararanga_Dam-Ibiuna_State_of_Sao_Paulo.html>. Acesso em: 28 jul. 2018.

TUCCI, A; SANT’ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v.26, n.1, p.97-112, 2003.

U.S.EPA. **Risk Assessment Guidance for Superfund: Volume III - Part A, Process for Conducting Probabilistic Risk Assessment**. EPA 540-R-02-002. 2001. Disponível em: < https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rags3adt_complete.pdf> Acesso em: 10 jan.2018.

U.S.EPA. **A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes.** EPA/630/P-02/002F. 2002.

U.S.EPA. **Guidelines for Carcinogen Risk Assessment.** EPA/630/P-03/001F. 2005.

U.S.EPA. **Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Cylindrospermopsin.** US Environmental Protection Agency. USA. Document NCEA-C-1763. 2006.

U.S.EPA. **Terminology Services - Vocabulary Catalog List Detail Report.** Last Update: September 2011. Disponível em: < https://ofmpub.epa.gov/sor_internet/registry/termreg/searchandretrieve/glossariesandkeywordlists/search.do?details=&glossaryName=Exposure%20Factors%20Glossary> Acesso em: 20 jun. 2018.

U.S.EPA. **Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories.** EPA 822-S-12-001. 2012.

U.S.EPA. **A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes.** EPA/630/P-02/002F. 2012a.

U.S.EPA. **Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems.** EPA-810F11001. 2014.

U.S.EPA. **Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Microcystins.** EPA- 820R15102. 2015a.

U.S.EPA. **Drinking water health advisory for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin.** EPA-820R15101. 2015.

U.S.EPA. **Exposure Factors Handbook: 2011 Edition.** EPA/600/r-090/052F. september 2011. Disponível em: < <https://www.nrc.gov/docs/ML1400/ML14007A666.pdf>> Acesso em: 03 ago.2017.

UTERMOHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-methodik. itteilungen Internationale Vereinigung theoretische und Angewandte Limnologie. v. 9 p.1-38. 1958.

VARGAS, R.S. **Influência da concentração de nutrientes na interação entre duas espécies fitoplanctônicas isoladas do Reservatório de Itupararanga – SP.** Dissertação de mestrado. São Carlos, 2012.

VELZEBOER, R.M.A. et al. Geographical patterns of occurrence and composition of saxitoxins in the cyanobacterial genus *Anabaena* (Nostocales, Cyanophyta) in Australia. **Phycologia**, v.39, p.395–407, 2000.

VIANA-VERONEZI, M. et al. Avaliação da remoção de saxitoxinas por meio de técnicas de tratamento das águas de abastecimento. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 14, n.2. p. 193-204, 2009.

VIDAL, L; KRUK, C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. v.3, n.2, p 142-151, 2008.

ZAJAC, M. P. **Investigação da Presença de Cilindrospermopsina e Saxitoxinas em Amostras de Águas Superficiais no Estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2006.

WATTS, J. S. et al. Acute toxicity of paralytic shellfish poison in rats of different ages. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 8, p:286-294. 1966.

WHO. **Guidelines for safe recreational water environments**. Volume 1: costal and fresh waters. Geneva. 2003. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42591/1/9241545801.pdf>>. Acesso em: out. 2016.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. 3rd ed. incorporating the 1st and 2nd addenda. Geneva. 2008. v. 1: recommendations. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf>. Acesso em: 23 out. 2016.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality fourth edition incorporating the first addendum**. ISBN 978-92-4-154995-0. Geneva. 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2017.

WIBERG, G.S.; STEPHENSON, N.R. Toxicologic studies on paralytic shellfish poison. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.2, p. 607-615, 1960.

WIESE, M. et al. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and its analogs. **Marine Drugs**. p. 2185-2211. 2010. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2920551/pdf/marinedrugs-08-02185.pdf> >.
Acesso em: 11 out. 2016.