



CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA

Purificação de saxitoxinas partir de extratos da cepa de *Cylindrospermopsis* sp. isoladas no Brasil-RS

*Purification of saxitoxins of extracts from *Cylindrospermopsis* sp. isolated in Brazil-RS*

Wilson Alves Colvara¹

RESUMO

Florações de cianobactérias representam um risco para a saúde pública devido à produção de cianotoxinas, como as saxitoxinas que são neurotóxicas. Métodos de controle dependem de padrões destas toxinas, que tem um custo elevado e devem ser importados. Além disso, os métodos tradicionais de purificação de saxitoxina baseiam-se na extração de toxinas bioacumuladas em tecidos de mariscos. Neste contexto, este trabalho apresenta um novo método cromatográfico, relativamente simples e eficiente, para a produção de padrão de saxitoxina, utilizando como matéria prima cepas de cianobactérias. Foi utilizada uma coluna empacotada com C18 e a fase móvel contém acetonitrila e ácido clorídrico, obtendo-se um padrão de pureza superior a 95%.

Palavras-chave: Saxitoxina, Purificação, Cianobactéria

ABSTRACT

Cyanobacteria blooms pose a risk to public health due to the production of cyanotoxins as saxitoxins, which are neurotoxins. Control methods rely on toxin standards, which are expensive and must be imported. Furthermore, traditional methods of saxitoxin purification are based on the extraction of toxins bioaccumulated in the shellfish tissue. In this context, this paper presents a new chromatographic method, relatively simple and efficient for production of saxitoxin standards, using as raw material, strains from cyanobacteria. A column packed with C18, the mobile phase used contains acetonitrile, and hydrochloric acid was used, yielding a pattern of purity above 95%.

Keywords: Saxitoxin, Purification, Cyanobacteria

DOI <http://dx.doi.org/10.15536/thema.13.2016.24-35.339>

¹FURG - Universidade Federal do Rio Grande

INTRODUÇÃO

As cianobactérias pertencem ao filo Procarionte, foram os primeiros organismos autotróficos que surgiram na terra há pelo menos 2,7 bilhões de anos, e originaram os plastídeos de todos os outros autotróficos por eventos de endossimbiose (Graham *et al.*, 2009). Em ambientes límnicos, as florações de cianobactérias estão relacionadas com eventos de eutrofização e alteração no equilíbrio entre os nutrientes da água (Carvalho, *et al.*, 2013).

As florações de cianobactérias são vistas com cautela pelas autoridades sanitárias, devido à capacidade de produção e liberação de toxinas (cianotoxinas) para o ambiente. Dentre as toxinas produzidas estão as saxitoxinas, também denominadas PSTs (*Paralytic Shellfish Toxins*), que são alcalóides hidrossolúveis e termoestáveis. A origem do nome decorre de que a produção desta toxina foi primeiramente detectada em alguns dinoflagelados marinhos, como *Alexandrium spp.* (*Gonyaulax spp.*), e quando filtrados pelos moluscos bivalves acumulam e transferem as toxinas através da cadeia trófica (Shimizu, 1987; White E Maranda, 1978). Os gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de saxitoxinas são: *Dolichospermum*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* (Carvalho, *et al.*, 2013), e *Raphidiopsis* (Yunes, *et al.*, 2007).

O efeito tóxico das PSTs ocorre pelo bloqueio dos canais de sódio eletro-dependentes, interrompendo a formação do potencial de ação nas membranas dos axônios e, conseqüentemente, a atividade neuronal. Dependendo da dose e do organismo, podem causar a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição (Durbin *et al.*, 2002; Kwong *et al.*, 2006).

A frequência com que as florações de cianobactérias ocorrem nos mananciais de abastecimento público, levaram autoridades a inserir o monitoramento de suas toxinas nas legislações de potabilidade de água em inúmeros países, o que também ocorreu no Brasil. A Portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde, estabelece os limites para as diferentes cianotoxinas, sendo 3,0 µg/L a concentração máxima permitida para as saxitoxinas. Os métodos analíticos utilizados para determinar sua concentração são a cromatografia líquida com detecção por fluorescência (CLAE-FD), espectrometria de massas (CL-EM e CL-EM/EM) e os ensaios imunoenzimáticos, sendo que todos requerem padrões da toxina. Os padrões comerciais disponíveis para a análise das saxitoxinas além de serem importados, portanto de aquisição lenta e onerosa, são purificados a partir de toxinas produzidas por dinoflagelados e não contemplam as mais de 57 variantes já determinadas (Wiese, *et al.*, 2011). Tendo em vista que as saxitoxinas encontradas nos mananciais são produzidas por cianobactérias, seria mais coerente a utilização de padrões de mesma origem evitando assim a possibilidade de análogos destas toxinas não serem detectadas pelos métodos analíticos, devido a inexistência de padrões. A falta de padrões de calibração coerentes com a realidade, tem dificultado a implementação destas técnicas em monitoramento de rotina das saxitoxinas (Watanabe, *et al.*, 2011), bem como em experimentos científicos, como avaliação dos seus efeitos no ambiente, remoção das toxinas, entre outros.

Além da indisponibilidade comercial de todas as variantes de saxitoxinas, outro agravante é que são poucas as publicações científicas que descrevem metodologias para produção de padrões de cianotoxinas, sendo ainda mais raras as publicações sobre produção de padrão de saxitoxinas. No trabalho de Laycock e colaboradores (Laycock, *et al.*, 1994) foi feito um detalhamento da metodologia e uma discussão sobre a importância da escolha do organismo produtor da toxina a ser purificada, no qual os autores consideraram ser mais adequada a obtenção de padrões de saxitoxinas a partir de

cianobactérias ao invés de mariscos. Entretanto, devido à bioacumulação que ocorre nos mexilhões estes podem conter até 50mg de toxina em 100g de hepatopancreas (Hsu, *et al.*, 1979), enquanto uma cepa da cianobactéria *Aphanizomenon flos-aquae*, por exemplo, tem apenas 3mg de toxina em 100g da cultura liofilizada. Então, mesmo cientes da diferente natureza da matriz e seus interferentes, por razão quantitativa os autores utilizaram o marisco para desenvolver uma metodologia complexa e demorada. No trabalho de Rubio e colaboradores (Rubio *et al.*, 2015) também foi utilizado como fonte de saxitoxina o mexilhão *Mytilus chilensis*, em função da disponibilidade local e pela alta concentração de toxina, que foi de 35mg de toxina em 100g de mexilhão, no desenvolvimento de uma metodologia que requer inúmeras etapas, na qual inicialmente são removidos os interferentes da matrix e posteriormente é feita a purificação efetiva da toxina.

Neste contexto, o presente trabalho inova ao desenvolver uma nova metodologia de purificação de saxitoxinas a partir de cepas de cianobactérias provenientes de mananciais do Rio Grande do Sul.

PARTE EXPERIMENTAL

CULTIVO DAS CÉLULAS PRODUTORAS DAS TOXINAS

O cultivo da cianobactéria *Cylindrospermopsis sp* utilizado neste trabalho foi obtido de um manancial de Farroupilha, no Rio Grande do Sul, e mantido na coleção de cultivos da Unidade de Pesquisa em Cianobactérias (UPC) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A cepa foi cultivada em meio ASM-1 (Gorham, *et al.*, 1964), em frascos de 20 L, previamente autoclavados, fotoperíodo de 12:12, temperatura de 25°C (± 2) e intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes brancas, frias, do tipo luz do dia e de 20 Watts de potência (Metting, *et al.*, 1994). Os cultivos foram retirados para extração e purificação das toxinas durante a fase exponencial de crescimento, previamente determinada mediante contagens das células e confecção da curva de crescimento nas mesmas condições.

PREPARAÇÃO DO CULTIVO E EXTRAÇÃO DAS TOXINAS

Os cultivos foram concentrados por centrifugação, durante 30 minutos a 104 x g e, posteriormente, filtrados. O material concentrado foi então submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para rompimento das células e liberação das toxinas. O extrato foi novamente centrifugado por 20 minutos a 104 x g, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante armazenado a temperatura de -20°C.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAXITOXINAS (PSTS) POR HPLC-RF

Todos os reagentes usados foram da marca Merck Brasil, de grau analítico ou cromatográfico. A água utilizada foi ultrapura, obtida a partir de osmose reversa (Milli-RO, Millipore®) seguida por troca iônica (Milli-Q, Millipore®). O método de determinação das saxitoxinas foi à análise cromatográfica com detecção por fluorescência e derivatização pós-coluna (Oshima, 1995). Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu LC-20A, composto por uma controladora CBM-20A, detector de fluorescência RF-10Axl, detector SPD-M20A UV-VIS, PDA (Photo Diode Array), bombas LC-20AD e forno de coluna CTO-20A, controlados através do software LabSolution 5.41.240. A coluna utilizada na análise foi a C8 (150 x 4,6 mm, D.I. 5 μm de partícula). O cálculo da concentração de toxinas na amostra foi feito por comparação entre as áreas dos picos das amostras e de padrões comerciais, analisados em triplicatas.

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A metodologia usada para análise de massa foi adaptada de Diener e colaboradores (Diener, et al., 2007), com uma coluna zic-HILIC: 150 x 1mm, partículas com 3,5 µm (Sequant Merck), com vazão de 40 µL.min⁻¹. A fase móvel A constituiu-se de formiato de amônio (5 mmol.L⁻¹) + Ácido Fórmico (0,05 %); e a fase móvel B, por acetonitrila/água (70/30). O cromatógrafo foi conectado a uma fonte ESI (Electrospray ionization) do EM (Esquire HCT, Bruker Daltonics - iontrap), com gás (N₂) de nebulização a 30 psi e a 250°C, e o gás de secagem com vazão de 5 L.min⁻¹. A corrida cromatográfica dividiu-se em dois segmentos: o primeiro, de 0 a 14,5 min, no modo negativo a 3000V; e o segundo, de 14,5 min em diante, no modo positivo a 3500V.

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICAÇÕES

Para determinação dos parâmetros de purificação foi utilizado o mesmo cromatógrafo das análises de determinação da concentração de saxitoxinas. A coluna usada para purificação, com as dimensões de 150 x 10 mm, foi recheada com C18 (Bulk Septra C18 – E 50 µm, 65 Å) no próprio laboratório, a temperatura do forno de coluna foi de 20°C e alça de amostragem (loop) de 1 mL.

O monitoramento dos compostos que eluíram durante a purificação foi feito por detecção de UV, com varredura de 190 a 800 nm. Este monitoramento teve por objetivos observar o perfil de absorção das STXs no UV, sendo que elas têm sua maior absorbância em 200 nm (Thibault, et al., 1991), e também verificar a presença de outros compostos contaminantes, que absorvem entre 190 a 800 nm. Após a passagem pelo detector de UV foram coletadas frações de 1 mL (de 30 em 30 segundos). Para as purificações, foram testadas três combinações de fases móveis:

- Fase móvel nº1 (adaptada de Soto, et al., 2010).

Eluente A: ácido octano-sulfônico (7,0 mmol L⁻¹), heptanosulfonato de sódio (7,0 mmol L⁻¹), fosfato de amônio (48,0 mmol.L⁻¹) e tetra hidro furano 1,0% (v/v). O pH foi ajustado a 7,0 com ácido fosfórico (20,0% v/v).

Eluente B: acetonitrila.

- Fase móvel nº2 (adaptada de Oshima, 1995)

Eluente A: heptanosulfonato de sódio (2,0 mmol L⁻¹), fosfato de amônio (30,0 mmol L⁻¹). O pH foi ajustado a 7,1 com hidróxido de amônio.

Eluente B: acetonitrila.

- Fase móvel nº3:

Eluente A: ácido clorídrico (0,05 mol.L⁻¹)

Eluente B: acetonitrila.

O fluxo no cromatógrafo foi ajustado a 2,0 mL.min⁻¹. As soluções foram preparadas com água ultra pura e testadas as 3 fases móveis. O aparelho foi estabilizado por 20 minutos, sendo então injetados 1,0 mL do extrato previamente preparado.

Para as corridas de purificação, foram testados diferentes gradientes entre os eluentes de cada fase móvel, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Gradientes entre os eluentes A e B que melhor separaram as toxinas para as diferentes fases móveis

Tempo (min.)	Fase Móvel nº1		Fase Móvel nº2		Fase Móvel nº3	
	% A	% B	% A	% B	% A	% B
0	100	0	100	0	100	0
10	90	10	97	3	90	10
30	85	15	90	10	50	50
40	50	50	50	50	50	50
50	0	100	0	100	0	100
60	100	0	100	0	100	0
80	100	0	100	0	100	0

As frações foram coletadas a cada 30s de corrida cromatográfica. As frações cujos tempos de retenção, visualizados no cromatograma de UV, correspondiam a picos no comprimento de 200 nm foram posteriormente analisadas por HPLC-RF, para certificação de que continham saxitoxinas, bem como avaliação da concentração e grau de pureza.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos concentrados do cultivo de *Cylindrospermopsis sp* apresentaram concentrações relativamente altas, 1mg.L-1 de saxitoxina (STX) com o tempo de retenção de 16,13 min e, aproximadamente, 3mg.L-1 de neosaxitoxina (Neo-STX) com o tempo de retenção de 10,78 min, possibilitando a purificação destas duas variantes, apesar da presença de uma série de interferentes nos extratos, como mostra a Figura 1.

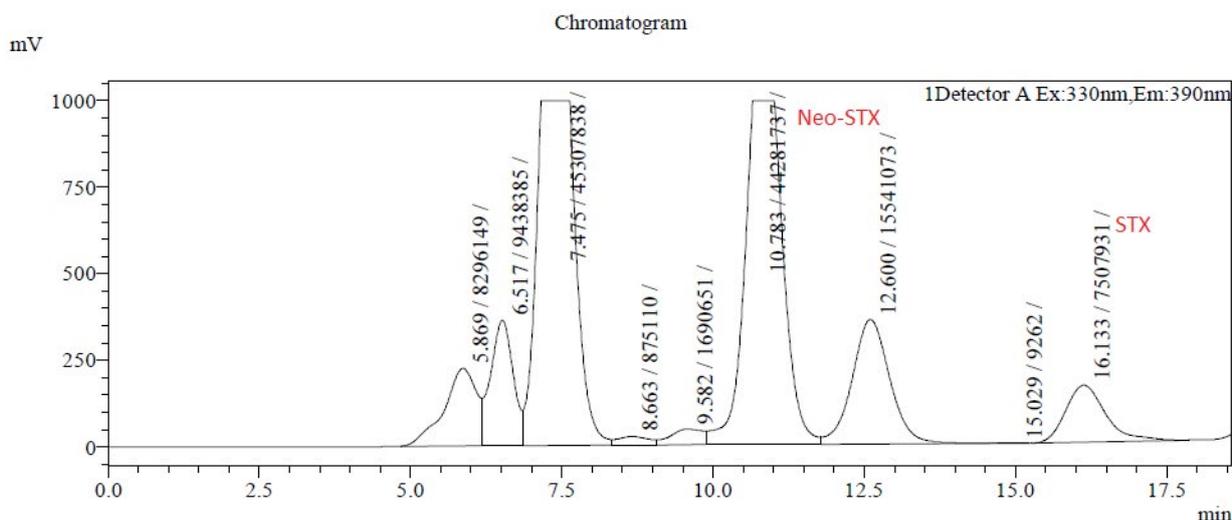


Figura 1. Cromatograma pelo método de pós-derivatização, método de Oshima (1995) do extrato bruto, pós-concentração

O monitoramento da análise em UV é uma ferramenta simples e não destrutiva, que permite selecionar, de forma rápida, as frações que devem ser analisadas em fluorescência. As frações analisadas são as que contêm os picos ou frações dos picos com absorvância em 200 nm (Figura 2).

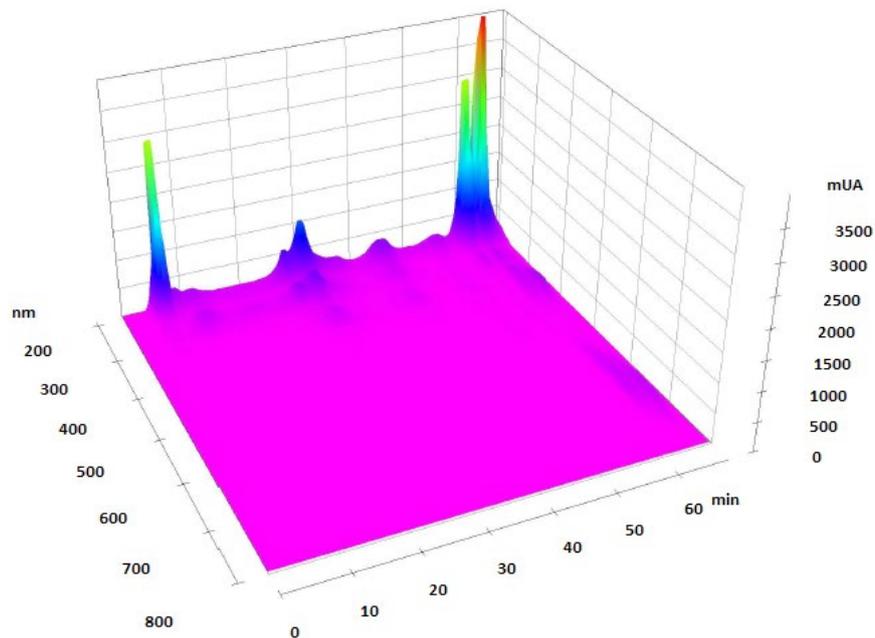


Figura 2. Espectro de UV em 3D das toxinas durante a purificação com a fase móvel 3, a partir do extrato bruto

Correlacionando-se estes cromatogramas foi possível determinar o perfil da absorvância e o tempo de retenção que continha as frações com PSTs. As toxinas foram encontradas entre a oitava e a vigésima fração coletada, que é o pico entre o tempo de retenção de quatro a dez minutos.

Dentre as fases móveis utilizadas, a nº3 foi a mais adequada à produção de padrões de saxitoxinas por apresentar a maior pureza, sendo superior a 95%, além de ser uma fase móvel constituída apenas por HCl (0,5 mol.L⁻¹) e acetonitrila (4 a 8%). Em condições normais de temperatura e pressão, a acetonitrila volatiliza facilmente e o padrão fica dissolvido apenas em HCl (0,5 mol.L⁻¹). Esta solução mantém as toxinas estáveis, sendo a mesma solução na qual os padrões comerciais vêm diluídos, evitando a utilização de tratamentos ou reações adicionais, que poderiam representar perdas e degradações das toxinas. As demais fases móveis testadas não apresentaram resultados satisfatórios, com frações de pureza das PSTs entre 80 e 90%, além de terem o inconveniente de conterem os sais de suas respectivas fases móveis dissolvidos, cuja remoção resultaria em perdas das toxinas.

Após a purificação, com os eluentes da fase móvel 3, utilizando-se do gradiente descrito na Tabela 1, as frações recolhidas foram analisadas. As frações que continham os maiores teores de toxina (>95% pureza) e que já estavam em HCl (0,05 mol.L⁻¹), foram separadas e consideradas padrões. Os padrões obtidos continham somente uma variante de PST (Figura 3 e 5), ou as duas (Figura 4), desta forma foram obtidos três tipos de padrões: o primeiro contendo apenas Neo-STX, o segundo com as duas variantes Neo-STX e STX e o último contendo apenas STX.

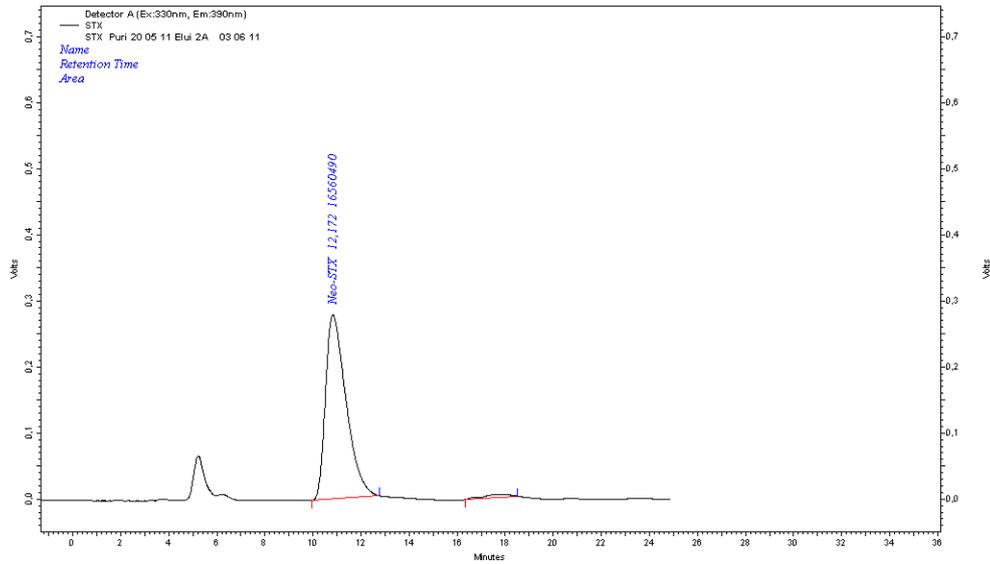


Figura 3. Cromatograma da fração que continha o maior teor de Neo-STX

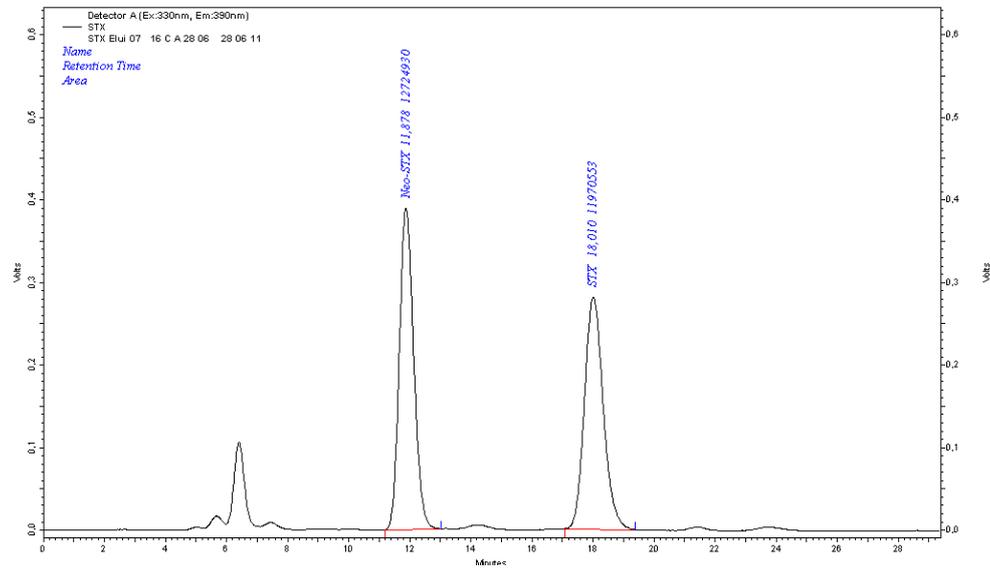


Figura 4. Cromatograma da fração que continham Neo-STX e STX

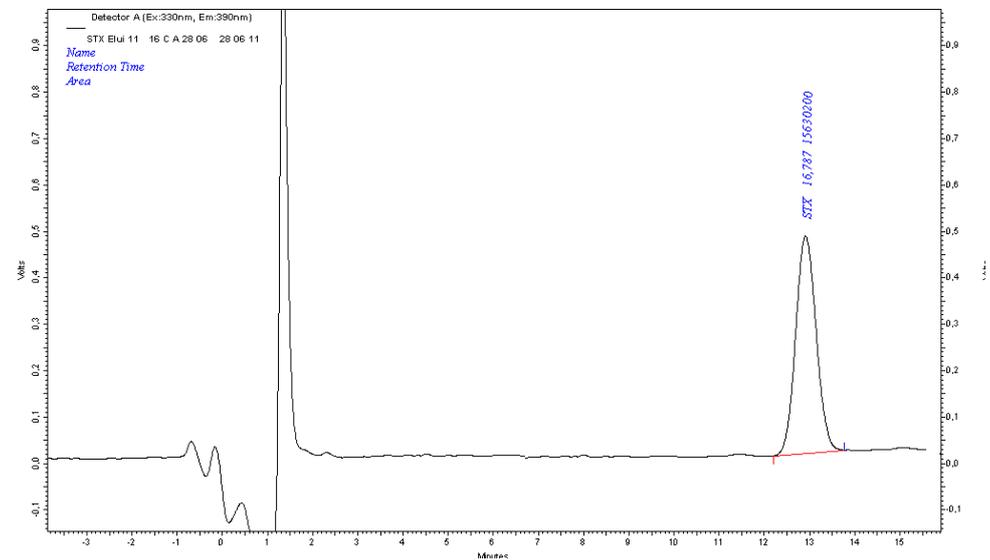


Figura 5. Cromatograma da fração que continha o maior teor de STX

O padrão de Neo-STX foi analisado por espectro de massa, e o resultado foi comparado aos padrões comerciais (Figura 6 e 7).

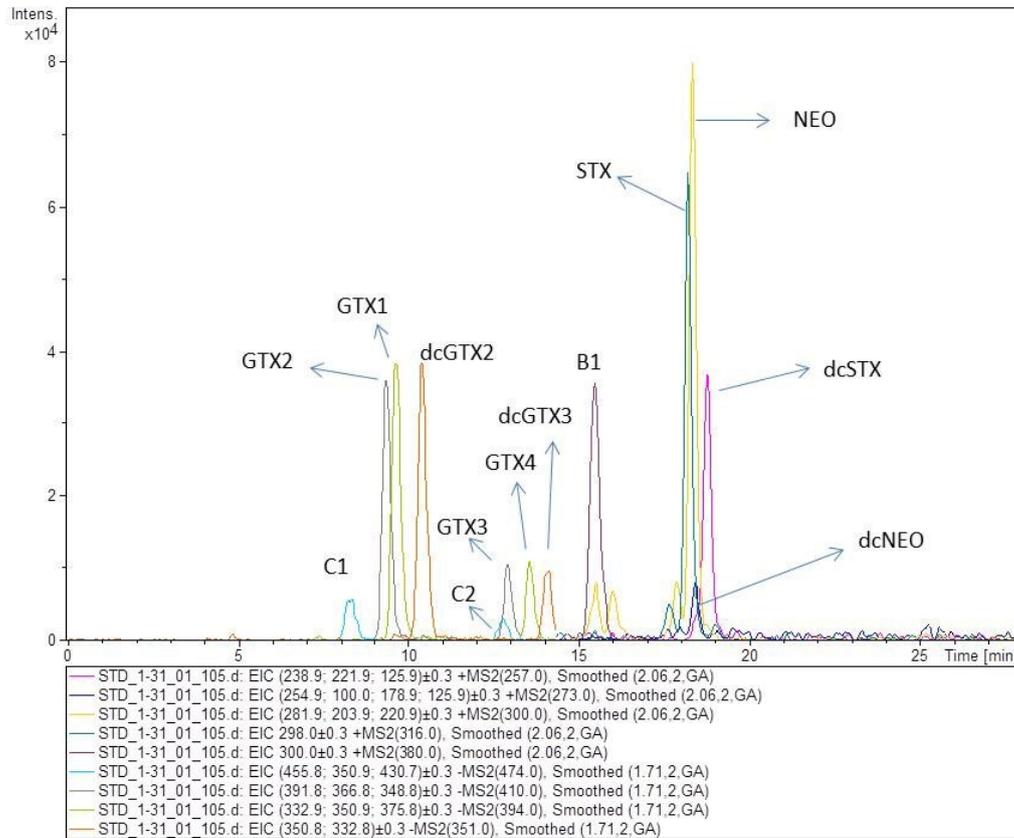


Figura 6. Cromatograma dos padrões comerciais de Saxitoxinas, analisados por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas

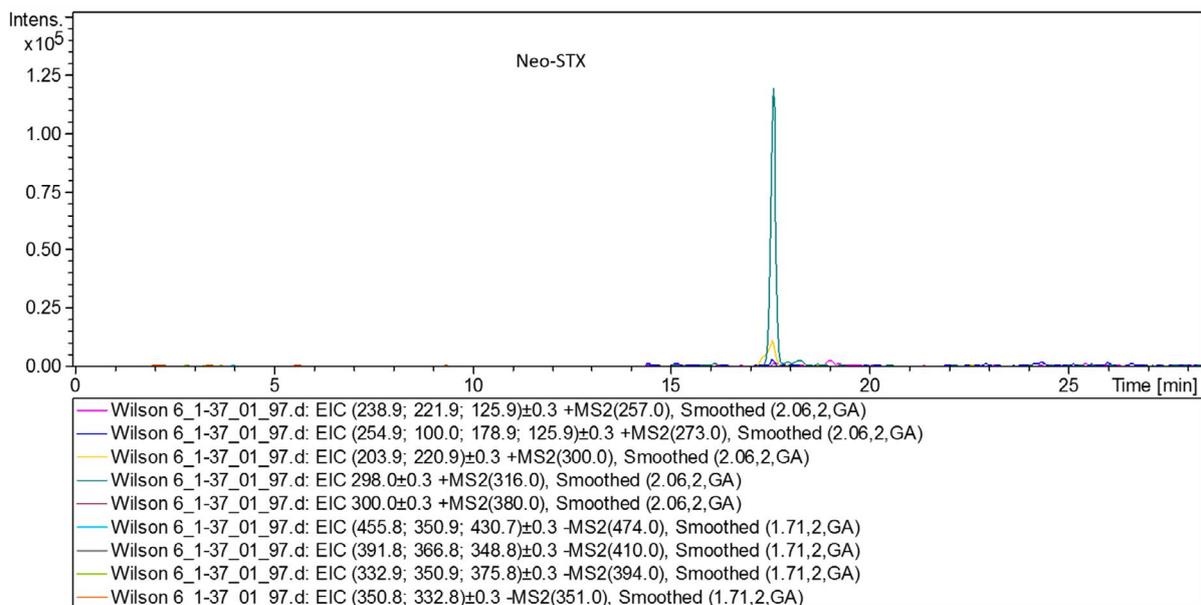


Figura 7. Cromatograma do padrão de Neo-STX produzido pela metodologia desenvolvida neste trabalho analisado por Espectrometria de Massas

Os padrões teve concentração de 1 mg.L^{-1} e pureza satisfatória, maior que 95% (baseada na varredura de 190 a 800 nm e por HPLC-FL), ideais para uso. As frações que não apresentaram pureza satisfatória foram armazenadas, e posteriormente reprocessadas. A cepa usada neste estudo produzia apenas os análogos de STX e Neo-STX, e o cultivo mostrou grande plasticidade na produção das variantes, em função da temperatura que foi cultivada. Com a temperatura de cultivo a 25°C a cepa produziu predominantemente Neo-STX e ao reduzir a temperatura para 16°C , esta cepa passou a produzir predominantemente STX (Medeiros, 2011), podendo assim ser uma ferramenta seletiva no processo de produção.

Os trabalhos existentes na literatura sobre a metodologia de purificação de PSTs, como o de Watanabe e colaboradores, detalham mais as interconverções químicas das variantes do que a metodologia de purificação em si, no qual estes autores apenas citam o uso de colunas de troca catiônica, com 40 cm de comprimento. O mesmo tipo de coluna é usado por Laycock e colaboradores, conforme o detalhamento da sua metodologia que tem como matéria prima hepatopâncreas de mariscos, a qual é extremamente demorada e complexa em função desta matéria prima utilizada.

A escolha da matéria prima é um dos fatores mais importantes para a preparação de padrões de calibração em grande quantidade. Os mariscos, uma das fontes naturais de PSTs mais importantes, são amplamente utilizados na produção dos padrões pois possuem um elevado teor de toxina, porém, são dependentes da ocorrência de eventos naturais de floração produtoras de PSTs para bioacumularem as toxinas (Oshima, *et al.*, 1982; Goto, *et al.*, 1998). Além disto, ocorrem reações químicas e enzimáticas nos mariscos que alteram a estrutura química dos análogos das toxinas (Oshima, *et al.*, 1995 b; Watanabe, *et al.*, 2011). Em função das alterações causadas na molécula, depois da purificação, deve-se realizar a conversão química das toxinas para que fiquem quimicamente iguais aos análogos encontrados no ambiente.

Outra fonte possível de ser utilizada são os cultivos de dinoflagelados potencialmente produtores de PSTs, como *Alexandrium excavatum* (Laycock, *et al.*, 1994) e *A. Tamarense* (Thomas, *et al.*, 2004), que podem representar matérias-primas apropriadas, em termos de fonte estável de toxinas. Algumas cianobactérias produtoras de toxinas, como *Anabaena circinalis* e *Aphanizomenon flos-aquae*, também são boas opções de matrizes (Watanabe, *et al.*, 2011). A utilização de metodologias para produção de padrões de PSTs usando como matéria prima as cianobactérias, é de extrema importância para estudos de monitoramento dos mananciais. Pois, no final do processo são obtidos padrões de variantes produzidas pelas cepas utilizadas, e que são os mesmos encontrados nos ambientes de estudo, podendo inclusive obterem-se variantes não disponíveis no mercado.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta uma metodologia nova e relativamente simples e eficiente para a produção de padrões de saxitoxinas. As matérias primas utilizadas foram basicamente o cultivo de *Cylindrospermopsis sp* e uma coluna de 10 x 150 mm, preenchida com C18. Salienta-se também que a fase móvel utilizada contém apenas ácido clorídrico ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) e acetonitrila, reagentes comuns em laboratórios e de fácil aquisição. A presente metodologia, além de ser muito mais simples do que as citadas e que utilizam mexilhões como fonte de toxinas, possibilitou a purificação das PSTs (Neo-STX e STX) com rendimento e pureza semelhantes aos verificados em outros trabalhos.

CONCLUSÃO

A utilização de cianobactérias como matéria prima para purificação de Saxitoxinas, proporcionou o desenvolvimento de uma nova, e simples, metodologia cromatográfica, pela qual obteve-se toxina com pureza elevada e quantidade adequada para serem utilizadas em experimentos e calibrações de equipamentos. A partir da metodologia apresentada e das cepas isoladas foi possível purificar as PSTs, Neo-STX e STX, igualmente a outros trabalhos, os quais têm uma metodologia mais complexa.

O presente trabalho proporcionará um avanço nos estudos de Saxitoxinas devido a simplicidade da sua metodologia. Diversos laboratórios podem utilizá-la obtendo uma variante com a estrutura química igual às produzidas pela cianobactéria em estudo, não se limitando a experimentos com moléculas comerciais que não apresentam todas as variantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas e a Universidade Federal do Rio Grande, que disponibilizaram os laboratórios. Bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela disponibilização de bolsas e recursos para desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, Maria Do Carmo; AGUJARO, Livia Fernandes; PIRES, Denise Amazonas; PICOLI, Claudia. **Manual de Cianobactérias Planctônicas: Legislação, Orientação sobre Monitoramento e Aspectos Ambientais.** Companhia Ambiental do Estado de São Paulo- CETESB: São Paulo, 2013.

DIENER, M.; ERLER, K.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B.; J. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal Of Separation Science.** 30, 1821-1826, 2007.

DURBIN, Edward.; TEEGARDEN, Gregory.; CAMPBELL, Robert.; CEMBELLA, Allan.; BAUMGARTHER Mark. F.; MATE, Bruce. R.; North Atlantic right whales, *Eubalaena glacialis*, exposed to paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins via a zooplankton vector, *Calanus finmarchicus* **Harmful Algae**, 1, 243-251, 2002.

GORHAM, P.R.; MCLACHLAV, J.R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K.; Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen der internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, vol. 15. 796-804, 1964.

GOTO, H.; IGARASHI, T.; SEKIGUCHI, R.; TANNO, K.; SATAKE, M.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T. A. ; In *Harmful Algae*; REGUERA, B., BLANCO, J., FERNANDEZ, M. L., WYATT, T.; A Japanese project for production and distribution of shellfish toxins as calibrants for HPLC analysis. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T, editors. **Harmful Algae.** Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; Xunta de Galicia, Spain, 216–219, 1998.

- GRAHAM, Linda ; WILCOX, Lee; GRAHAM, James. **Algae**, 2th ed., New York: Benjamin Cummings, 2009.
- HSU, C.P, MARCHAND, A, SHIMIZU, Y, SIMS G.G. Paralytic Shellfish Toxin in the Sea Scallop, *Placopecten magellanicus*, in the Bay of Fundy. **Journal off the Fisheries Research Board Canadian**. 32-36, 1979.
- KWONG, Raymond. W. M.; WANG, Wen-Xiong.; LAM, Paul. K. S.; YU, Peter. K. N; The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates Aquatic. Toxicol. **80, 82, 2006**.
- LAYCOCK, Maurice. V.; THIBAUT, Pierre.; AYER, Stephen. W.; WALTER, John. A.; Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. **Natural Toxins**, 2, 175-183, 1994.
- LEE, Robert Edward. **Phycology**. Cambridge Cambridge: University Press, 2008.
- World Health Organization Yuzuru. Dinoflagellate toxins. In: Taylor, F. J. R. (Ed.).. **Guidelines for drinking-water quality incorporating first addendum**. Vol. 1, Recommendations. – 3th ed., 2006.
- MEDEIROS, Rafael. S. **Efeito da temperatura na composição das variantes de toxinas paralíticas marinhas e no crescimento em uma cepa brasileira de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria)**. Rio Grande, FURG, Monografia 2011, Graduação em Oceanologia, Instituto de Oceanografia Universidade Federal do Rio Grande, 2011.
- METTING, F.B. Jr.; **Algae and Cyanobacteria, Methods of Soil Analysis**, Part 2 –Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Book 5 ed. Science Society of America In. 1994.
- OSHIMA, Yasukatsu.; Post column derivatization liquid chromatography method for paralytic shellfish toxins. **Journal Association of Official Agricultural Chemists International**. 78, 528-532. 1995.
- OSHIMA, Yasukatsu; YASUMOTO, T.; KODAMA, M.; OGATA, T.; FUKUYO, Y.; MATUURA, F.; Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku distinct. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**. 48, 525–530, 1982.
- OSHIMA, Yasukatsu. **Harmful Marine Algal Blooms**; Lassus, P.; Arzul, G.; Erard, E.; Gentien, P.; Marcaillou, C. (Eds). Harmful Marine Algal Blooms, Paris, Technique et Documentation-Lavoisier/ Intercept Paris, France, p. 475, 1995 b.
- PADILHA, Alexandre Rocha Santos, **PORTARIA Nº- 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011**, Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/PORTARIA%20No-%202.914,%20DE%2012%20DE%20DEZEMBRO%20DE%202011.pdf> Acesso em: 05/10/2015
- RUBIO, D.P; ROA, L.G; SOTO, D.A; VELASQUEZ, F.J; GREGORCIC, J.A; SOTP, J.A; MARTINEZ, M.C; KALERGIS, A.M; VASQUEZ, A.E. Purification and characterization of saxitoxin from *Mytilus chilensis* of southern Chile. **Toxicon**, 108, 147-153, 2015.

SHIMIZU, Y; Biology of Dinoflagellates. **Blackwell Scientific:** Oxford. 1987.

SOTO, Liebe. K.; MURILLO, A. A.; KROCK, B.; STUCKEN, B.; FUENTES, Valdés. J. J.; TREFAULT, N.; CEMBELLA, A.; VÁSQUEZ, M.; Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. **Toxicon**. 56, 1350-1361, 2010.

THIBAUT, P.; PLEASANCE, S.; LAYCOCK, M.V. Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. **Journal Chromatogr.**, 483-501,1991.

THOMAS, K.; Blay, P.; BURTON, I.W.; CEMBELLA, A.D.; CRAFT, C.; CRAIN, S.; HARDSTAFF, W.R.; LAYCOCK, M.V.; LEBLANC, D.; LEBLANC, P.; Certified reference materials for marine algal toxins. In: Steidinger KA, Landsberg JH, Tomas CR, Vigo GA, editors. **Harmful Algae**. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; St Petersburg, Florida, FL, USA: 216–218, 2004.

WATANABE, Ryuichi.; SUZUKI Toshiyuki,; OSHIMA, Yasukatsu; Preparation of Calibration Standards of N1-H Paralytic Shellfish Toxin Analogues by Large-Scale Culture of Cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04). **Marine Drugs**, 9, 466-477, 2011.

WHITE, Alan .W.; MARANDA, Lucie . Paralytic toxins in the dinoflagellate *Gonyaulax excavata* and in shellfish. **Journal off the Fisheries Research** Board Canadian. 35, 397, 1978.

WIESE, Maria; D'AGOSTINO, Paul. M; MIHALI Troco. K; MOFFITT, C. Michelle; NEILAN, Brett. A.; Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs **Marine Drugs**, 8, 2185-2211, 2010.

YUNES, João Sakis., ROCHA, Sabrina. De La, GIROLDO, Danilo., MELCHER, Silvia.Susanne., SANT ´ANNA, Célia.Leite., Silveiras., COMIN, Rubens., BICHO, Mirian. Da Silva. & VIEIRA, Armando Augusto Henriques. Release Of Carbohydrates And Proteins By A Subtropical Strain Of. **Journal of Phycology**, 585-591 2009.