



## **I-319 - OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS COM O USO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DIFERENTES VALORES DE pH: ENSAIOS PRELIMINARES EM ESCALA DE BANCADA**

**Rogério Pinheiro Magalhães Carvalho<sup>(1)</sup>**

Engenheiro Civil pela Universidade Estadual do Maranhão. Mestre em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pelo Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília. Analista em Ciência e Tecnologia da Capes. Doutorando em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pela Universidade de Brasília.

**Cristina Célia Silveira Brandão**

PhD, Professora Adjunta da Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** QNL 01, Bloco D, Apto. 125, Taguatinga Norte, Brasília-DF, CEP: 72150-114. Tel: (61)3307-2304 R.39. E-mail: [rpmcarvalho2000@yahoo.com.br](mailto:rpmcarvalho2000@yahoo.com.br).

### **RESUMO**

A proliferação de cianobactérias em mananciais eutrofizados é uma realidade global e, como consequência, há um aumento do risco de contaminação das fontes de abastecimento de água com cianotoxinas produzidas por esses organismos. Há vários relatos publicados de intoxicação por ingestão de águas contaminadas por cianotoxinas, que levaram animais e seres humanos a óbito. Diante da proliferação das cianobactérias nos mananciais, é preciso inovar no processo de tratamento da água, desenvolvendo novas tecnologias e/ou adequando as formas de tratamento tradicionalmente utilizadas. Uma alternativa que se apresenta é a utilização da oxidação com o uso do cloro, uma vez que essa substância química é largamente utilizada pelas Companhias de Saneamento no processo de desinfecção de água. Assim, o presente trabalho relata os resultados preliminares de um estudo que tem como objetivo maior investigar o desempenho, e fatores intervenientes, da cloração na oxidação de água com elevada concentração de saxitoxinas. Os testes, em escala de bancada, foram realizados para diferentes valores de pH da amostra de água e com diferentes dosagens de cloro, utilizando-se uma dosagem máxima de 32,2mg/L de cloro livre em valor de pH 5 da água de estudo. A concentração de saxitoxinas atingiu o valor máximo de 86,2µg/L e mesmo sendo utilizadas dosagens elevadas de cloro, não foi observada remoção notável de uma das variantes de saxitoxinas (neoSTX), que permaneceu com a sua concentração acima do valor máximo recomendado pela Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cianobactérias, Saxitoxinas, Cianotoxinas, Oxidação, Cloração, Tratamento de Água.

### **INTRODUÇÃO**

O crescimento populacional e a intensa produção agrícola e industrial são fatores que favorecem a eutrofização de lagos e reservatórios. Como consequência, as águas se tornam propícias à proliferação de algas e cianobactérias. Segundo Miao e Tao (2008), o aumento da eutrofização das águas doces superficiais pode levar à ocorrência de florações de cianobactérias, sendo que cerca de 50% a 70% das quais são conhecidas por serem tóxicas.

As cianobactérias podem produzir gosto e odor desagradáveis, comprometendo a qualidade da água para consumo. No entanto, o agravante maior é a produção de diversos tipos de toxinas (cianotoxinas), que têm o potencial de contaminar as águas para fins potáveis, recreativos e agrícolas.

As cianotoxinas provocam efeitos adversos na saúde humana, os quais estão evidenciados em estudos epidemiológicos e toxicológicos. Relativamente ao modo de ação, as cianotoxinas podem apresentar ações agudas ou crônicas, conforme o grau e o tempo de exposição. Há muitos relatos de mortes de animais e de seres humanos que fizeram uso de águas contaminadas por toxinas de cianobactérias. Países como Austrália, Inglaterra, França, Nova Zelândia, Canadá, Estados Unidos, China, Brasil, dentre outros, já relataram casos de intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de cianotoxinas presentes nas águas de abastecimento (Hoeger et al., 2005). Na China, por exemplo, a incidência de câncer no fígado foi claramente relacionada



com fontes de água contaminadas, sendo consideravelmente maior em populações que usaram águas superficiais infestadas com cianobactérias em relação as que consumiram águas subterrâneas.

Para Teixeira et al. (1993), há forte evidência entre a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica, Estado da Bahia, e a morte de 88 pessoas, entre as cerca de 2000 intoxicadas pelo consumo de água do reservatório, entre março e abril de 1988. Mas foi o acontecimento de intoxicação ocorrido em 1996, na cidade de Caruaru, estado de Pernambuco, onde morreram vários pacientes de uma clínica de hemodiálise, que confirmou definitivamente a ocorrência de cianotoxinas nas águas brasileiras Azevedo (1996).

Para minimizar a ameaça de contaminação da água para consumo humano com cianotoxinas, a remoção de cianobactérias tem sido estudada por meio da aplicação de tecnologias que envolvem processos físicos, químicos e biológicos de tratamento. Dentre os processos, a oxidação química pode ser uma opção promissora na eliminação de cianotoxinas dissolvidas. Por essa razão, o estudo do cloro, como oxidante, é uma estratégia no combate de toxinas dissolvidas por ser a substância química mundialmente utilizada no pré-tratamento e na desinfecção das águas (Acero et al., 2005).

Ho et al. (2006), analisando o processo de oxidação com o cloro em dois tipos de água (água com matéria orgânica e água Milli Q), com concentração de 20µg/L de quatro análogos de microcistinas (MC-LR, MC-LA, MC-RR e MC-YR), obtiveram remoções superiores a 90% nas duas amostras de água. Para isso, eles utilizaram uma dosagem de 1,5mg/L de cloro e um tempo de contato de 30 minutos, com o pH mantido abaixo de 8.

Em condições semelhantes aos experimentos realizados por Ho et al. (2006), Rodríguez et al. (2008) realizaram testes com dois análogos de microcistinas (MC-LR e MC-RR) e confirmaram a eficiência do cloro em remover essas toxinas da água. Para uma concentração inicial de MC-LR, MC-RR e cloro de 244,2mg/L, 193,2mg/L e 34,1mg/L, respectivamente, as concentrações remanescentes de MC-LR e MC-RR foram de 46,4 e 30,6mg/L, respectivamente, depois de um tempo de contato de 30 minutos. Esses resultados indicam uma eficiência de remoção superior a 80%, confirmando os resultados encontrados por outros autores. Diante do sucesso obtido na remoção de microcistinas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do processo de oxidação com o hipoclorito de sódio em remover saxitoxinas dissolvidas na água, uma vez que são raros os relatos de oxidação dessa neurotoxina, frequentemente presente em vários mananciais brasileiros onde ocorre a presença de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um trabalho experimental que consistiu na oxidação com o cloro livre, gerado a partir do hipoclorito de sódio, de três variantes de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX), sob a condição de diferentes valores de pH. Os experimentos, de caráter preliminar, foram realizados utilizando-se os dispositivos de agitação de um equipamento para teste de jarros e recipientes de vidros (béqueres de 1000mL). A Figura 1 apresenta as amostras de água de estudo contendo saxitoxinas dispostas nos béqueres durante os ensaios. A água de estudo era obtida por meio da diluição de material oriundo da lise de células da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*, cultivadas na sala de cultivo do Laboratório de Análise de Água do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília.

Para a preparação da água de estudo se fazia necessário submeter o material lisado (gelo/degelo do cultivo por três vezes consecutivas) à filtração em membrana de retenção de 8µm, seguida de membrana de microfibras de vidro de 1µm e, finalmente, em membrana de éster de celulose de 0,45µm. Essa sequência de filtração tinha como objetivo remover os fragmentos de células lisadas. O material filtrado era então diluído na proporção de 1:1 com água Milli-Q para obtenção da água a ser oxidada. Dessa forma a água de estudo continha as saxitoxinas mencionadas e também outros compostos liberados durante o processo de lise celular.

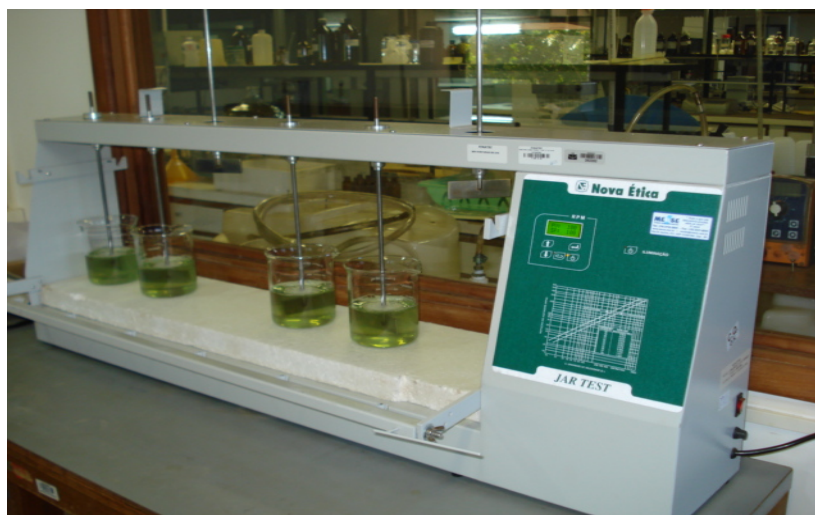


Figura 1 – Disposição das amostras de saxitoxinas durante o processo de oxidação

Os ensaios de oxidação foram feitos em duplicata para a verificação da reprodutibilidade dos resultados e houve o controle da dosagem de cloro aplicada, chamada de “branco”, também realizado em duplicata para cada valor aplicado.

Os testes preliminares consistiram na aplicação de 5 dosagens de cloro livre em cada sequência de análise. O valor do pH em cada teste foi ajustado para 5,0, 5,5 e 6,0, sendo que os valores de pH na água bruta variaram de 7,4 a 7,8; a temperatura do ar variou entre 22°C e 26°C e a temperatura da água variou entre 18°C e 25°C. A Figura 2 mostra o fluxograma dos ensaios de oxidação das saxitoxinas com o cloro livre (hipoclorito de sódio).

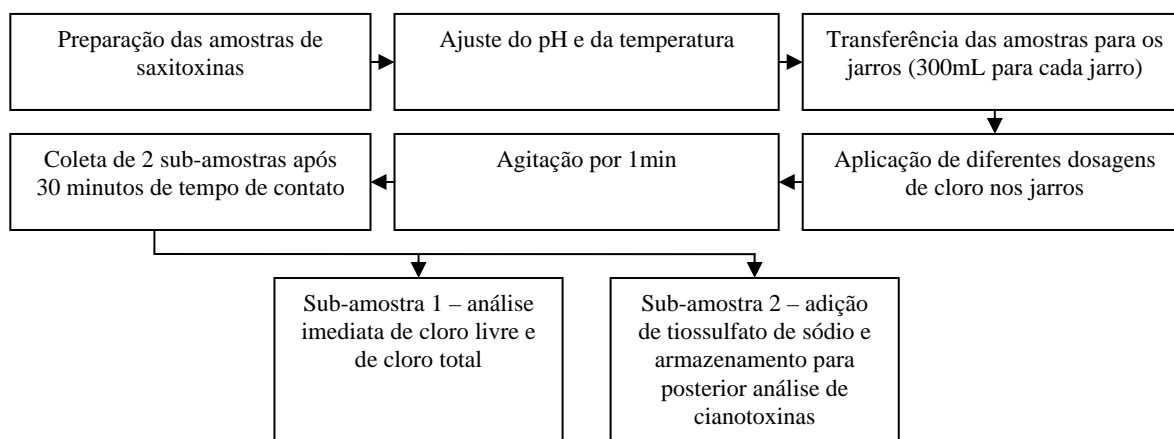


Figura 2 – Fluxograma dos procedimentos de execução dos testes de oxidação com o cloro livre sobre as saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX)

O método utilizado para a detecção das saxitoxinas foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), também conhecido como HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Essas análises foram baseadas na metodologia descrita por Oshima (1995), que envolve a oxidação pós-coluna e detecção por fluorescência.

## RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

Em todos os testes realizados, procurou-se aproximar as dosagens aplicadas aos valores de 2mg/L, 6mg/L, 12mg/L, 18mg/L e 24mg/L de cloro, os quais foram as doses inicialmente propostas para este trabalho. No entanto, devido à alta concentração da solução de hipoclorito de sódio, produzida no local por meio de eletrólise do NaCl (sal de cozinha), e de outras interferências externas, como a variação na pipetagem da solução, as dosagens resultaram em valores diferentes da proposta inicial. Assim, os valores das concentrações de cloro mostradas na Tabela 1 representam a média dos valores medidos nos frascos de controle de dosagem.

Tabela 1 – Condições de realização dos testes preliminares

Nº do teste	Dosagens de cloro livre aplicadas (mg/L)	pH da amostra	Concentração inicial de saxitoxinas (µg/L)		
			neoSTX	dcSTX	STX
1	2,8 – 7,3 – 16,4 – 25,6 – 32,2	5,0	83,3	4,8	2,5
2	3,8 – 8,0 – 13,8 – 21,4 – 28,5	5,5	86,2	6,6	0
3	1,7 – 5,0 – 7,7 – 12,8 – 17,7	6,0	73,7	0	8,4

De modo geral, ao aplicar uma dose entre 1,7mg/L a 3,8mg/L de cloro, ocorria o consumo quase que total da mesma. Porém, com a adição de doses acima de 6mg/L, eram observados valores residuais de cloro, chegando a valores maiores do que 4mg/L para o cloro livre e de 10mg/L para o cloro total, indicando a formação de cloro combinado. A Figura 3 mostra as concentrações de cloro livre e de cloro total depois de um tempo de contato de 30 minutos.

Os valores de concentração de cloro nos frascos de controle de dosagem, no tempo de contato 30 minutos, foram próximos aos valores iniciais em todos os ensaios, indicando que não havia perda de cloro significativa durante os ensaios, de modo que o consumo de cloro observado é atribuído às reações de oxidação entre as saxitoxinas e outros compostos intracelulares presentes na água de estudo.

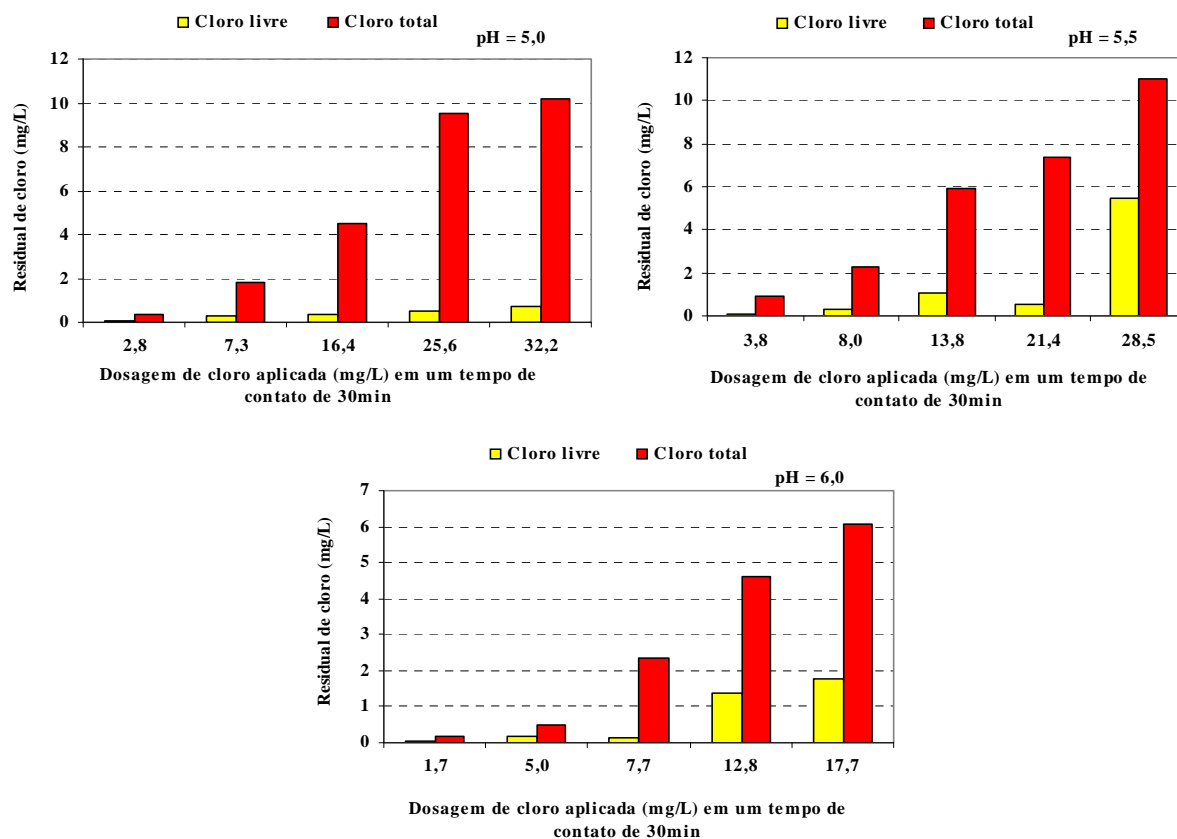


Figura 3 – Doses de cloro aplicadas e residuais de cloro livre e de cloro total depois de um tempo de contato de 30 minutos.

Com relação às saxitoxinas, ao adicionar certa dose de cloro à solução contendo as três variantes (neoSTX, dcSTX e STX), observou-se mudanças nos valores de concentração dessas cianotoxinas, havendo reduções e aumentos nas concentrações em função do valor de pH. Esse fato se repetiu em todos os ensaios, tanto em baixas quanto em altas doses de cloro livre. A Figura 4 mostra as variações das concentrações de saxitoxinas para as diferentes doses de cloro e para os três valores de pH, após o tempo de contato de 30 minutos.



Dos resultados mostrados na Figura 4, é possível observar que a neoSTX, presente em elevada quantidade, não foi removida significativamente, mesmo com o uso de doses elevadas de cloro e presença de residual desse composto, permanecendo sempre acima de 50µg/L. De fato, no caso dos valores de pH de 5,5 e de 6,0, há uma tendência inicial à redução da concentração com o aumento da dosagem de cloro, porém, com uso de doses mais elevadas, a concentração de neoSTX volta a crescer. O comportamento das demais variantes é aleatório, porém, com tendência ao aumento no valor de pH mais elevado (pH = 6).

Esse comportamento aleatório da dcSTX e da STX, frente às diferentes concentrações de cloro, pode ser devido às transformações que ocorrem entre as variantes das saxitoxinas, conforme relatado em diversos trabalhos (Shimizu e Yoshika, 1991; Indrasena e Gill, 1999; Sako et al., 2000; Castro et al., 2004). Os autores fazem referência à degradação e consequente transformação das saxitoxinas, por meio do aquecimento das amostras e quando estas são analisadas em diferentes intervalos de tempo. Essa hipótese deve ser investigada cuidadosamente.

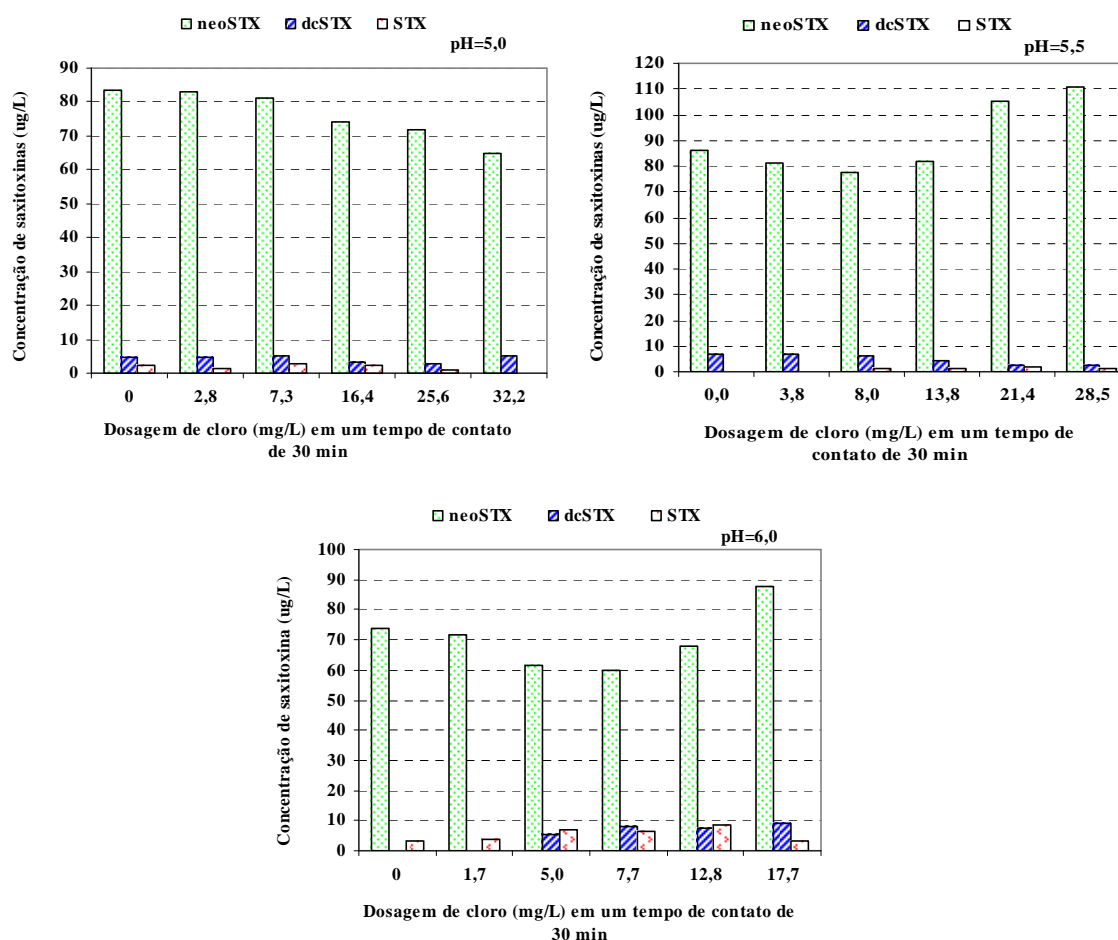


Figura 4 - Concentrações de saxitoxinas para as diferentes dosagens de cloro livre e de pH em um tempo de contato de 30 minutos

A influência da degradação natural das saxitoxinas durante os ensaios foi avaliada, tendo em vista que um ensaio demorava em média 6 horas para ser concluído. Assim, uma alíquota de 10mL da água de estudo foi retirada da amostra no início do ensaio ( $t = 0$ ), sendo imediatamente congelada para preservação até a análise em CLAE. O restante da amostra foi mantida sob as mesmas condições de análise (tempo, temperatura, e grau de agitação). Após 3 horas de ensaio, coletou-se uma nova alíquota de 10mL da água de estudo e congelou-se para posterior análise. As alíquotas coletadas foram descongeladas ao mesmo tempo e analisadas em sequência. A Figura 6 mostra os cromatogramas referentes ao tempo zero ( $t = 0$ ) e ao final de 3 horas dos ensaios ( $t = 3$  horas).



A Figura 5 revela que não houve alteração do comportamento das amostras coletadas em intervalos de tempo diferentes, apesar desse intervalo ter sido igual a 3 horas, sendo descartada a possibilidade de degradação natural das saxitoxinas durante o tempo dos ensaios. Esse resultado é análogo ao encontrado por Freitas (2007), que avaliou a degradação de saxitoxinas durante o intervalo de 30 minutos.

Além do fenômeno das transformações das saxitoxinas, sabe-se que durante a lise das cianobactérias, um grande número de compostos orgânicos são liberados para a água. Wetzel (2001) explica que esses compostos solúveis podem incluir ácido glicólico, carboidratos, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos, fosfatos orgânicos, substâncias voláteis, enzimas, substâncias hormonais, inibidores e toxinas. Diante dessa variedade de substâncias, parte da dosagem de cloro livre aplicada atua sobre elas, influenciando a oxidação das saxitoxinas. Como parte significativa do cloro residual se apresenta (ver Figura 3) sob a forma de cloro combinado e é sabido que esse composto não é um oxidante tão forte como o cloro livre, as toxinas tendem a permanecer estáveis na solução. Para verificar a eficiência do cloro combinado na oxidação dessas toxinas um maior tempo de contato seria necessário. Essa hipótese, também merece verificação.

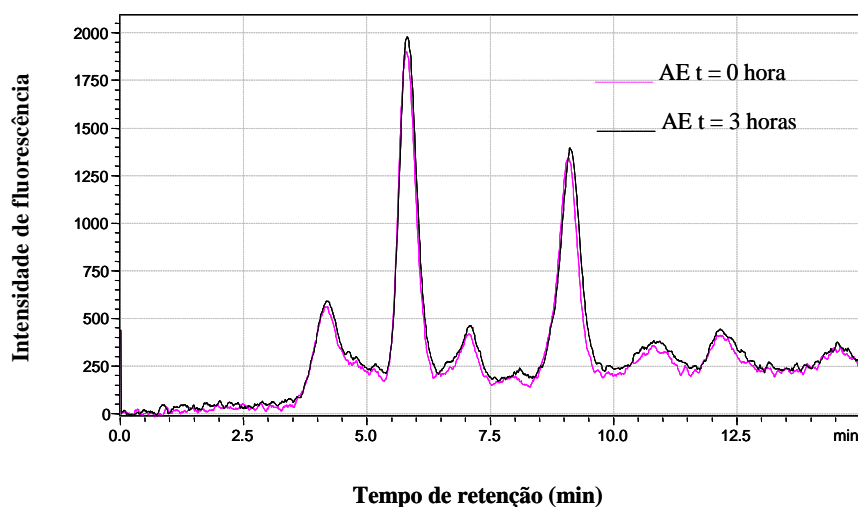


Figura 5 – Comportamento do cromatograma no tempo zero ( $t = 0$ ) e ao final de 3 horas ( $t = 3$  horas) no ensaio com saxitoxinas sem adição de oxidante

Shimizu (1988, citado por Indrasena e Gill, 1999) indica que a STX é muito estável em soluções ácidas, enquanto que a neoSTX não é, tendendo a decompor-se por segmentação redutiva do grupo N-hidroxila (N-OH) para originar STX. Um processo redutivo cria um ânion doador que transfere o excesso de carga para o poluente, no caso, a toxina, e posteriormente, o processo pode ser degradado por oxidação.

As toxinas transformam-se em consequência de conversões químicas, freqüentemente de formas menos tóxicas para formas mais tóxicas, tal como acontece com os análogos das saxitoxinas. A STX e a dcSTX são os produtos finais detectáveis das várias C-toxinas e goniatoxinas (GTXs), que sofrem ação química, segmentação redutiva (dessulfatação e deshidroxilação) e hidrólise (decarbamoilação e dessulfatação) (Gárate-Lizárraga et. al., 2004).

Strichartz (1984), estudando a estrutura química da molécula de STX e a influência do pH, resalta que essa variante e todos os seus derivados, exceto a neoSTX, possuem estruturas tóxicas e cargas elétricas essencialmente constantes abaixo de pH 6,5. Para esse autor, a carga nos dois grupos “guanidinium” pode ser a chave para se determinar a constância em termos de toxicidade da STX em valores de pH ácidos. Essa carga é devido à protonação desses grupos básicos e pode ser removida pelo aumento do pH.

Além de contribuir para o aumento de dcSTX, as toxinas do grupo N-sulfocarbamoil também podem favorecer o surgimento de neoSTX e de STX (Fast et al., 2006; Jaime et al., 2006; Vale, 2006; Tao e Tian-Jiu, 2008). Porém, essa hipótese não pôde ser verificada, tendo em vista a não disponibilidade de padrões para a variante C-toxinas. O fato é que a demanda de cloro exercida, a presença de cloro combinado e a influência do pH podem explicar a baixa efetividade do cloro em oxidar as variantes de saxitoxinas estudadas, conforme as considerações levantadas pelos diversos autores citados neste trabalho.



## CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados no presente trabalho e considerando as condições experimentais adotadas, concluiu-se que:

- As saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) parecem apresentar mecanismos de oxidação por hipoclorito de sódio mais complexos que as microcistinas, uma vez que nos valores de pH indicados como mais efetivos para oxidação com cloro livre (valores de pH mais ácidos) e adoção de doses tão elevadas como 32,2mg/L, não foi possível promover redução apreciável nas concentrações dessas neurotoxinas.
- Por influência da dose e espécies de cloro presentes, além do valor do pH da solução, pode ter ocorrido o fenômeno da interconversão entre as variantes das saxitoxinas estudadas, situação já verificada em outros grupos de saxitoxinas.
- Os resultados indicam que o processo de oxidação de saxitoxinas com o uso do cloro é complexo e é um aspecto crítico no tratamento de água com elevada concentração dessas toxinas, necessitando, portanto, que estudos adicionais sejam realizados para validar as hipóteses levantadas, numa tentativa de se conhecer a influência dos parâmetros intervenientes no processo de oxidação de modo a para garantir a segurança da água de consumo humano com relação a essas toxinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azevedo, S.M.F.O. (1996). "Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy." *IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia*. Livro de Resumos, 84p.
2. Acero, J. L., Rodriguez, E., Meriluoto, J. (2005). "Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins." *Water Research*, 39, 1628-1638.
3. Artigas, M. L., Vale, P. J. V., Gomes, S. S., Botelho, M. J., Rodrigues, S. M., Amorim, A. (2007). "Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity". *Journal of Chromatography A*, 1160, 99-105.
4. Azevedo, S. M. F. O e Magalhães, V. F. (2005). Metodologia para Quantificação de Cianotoxinas. *Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC)*, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
5. Castro, D., Vera, D., Lagos, N., García, C. e Vasquez, M. (2004). "The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanoacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10." *Toxicon*. 44, 483-489
6. Fast, M. D., Cembella, A. D., Ross, N. W. (2006). "In vitro transformation of paralytic shellfish in the clams *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*." *Harmful Algae*, 5, 79-90p.
7. Freitas, M.S. (2007). *Remoção de Microcistinas e Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Hipoclorito de Sódio: Avaliação em Escala de Bancada*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-107/07, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, DF, 111p.
8. Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Alonso-Rodríguez, R., Luckas, B. (2004). "Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California." *Baseline/Marine Pollution Bulletin*, 48, 378-402p.
9. Himberg, K., Keijola, A. M., Hiisvirta, L., Oyysalo, H., Sivonen, K. (1989). "The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from Microcystis and Oscillatoria cyanobacteria: A laboratory study." *Water Research*; 23(8), 979-984.
10. Ho, L., Onstad, G., Von Gunten, V., Rinck-Pfeihher, S., Graig, K., Newcombe, G. (2006). "Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues." *Water Research*, 40, 1200-1209p.
11. Hoeger, S. J., Hitzfeld, B. C., Dietrich, D. R. (2005). "Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 231-242.
12. Indrasena, W.M., Gill, T.A. (1999). "Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands." *Food Research International*, 32, 49-57.
13. Jaime, E., Gerdts, G., Luckas, B. (2007). "In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues." *Harmful Algae*, 6, p 308-316.
14. Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. O., Oshima, Y. (1999). "The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil". *Toxicon*, 37, 1359-1373.
15. Miao, H., Tao, W. (2008). "The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal." *Separation and Purification Technology*, SEPPU-9396, 7p.



16. Oliveira, J.M.B. (2005). “Remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* por meio de sedimentação e de flotação: avaliação em escala de bancada.” Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-085/05, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 122p.
17. Oshima, Y. (1995). Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: Hallegraef GM, Anderson, D.M., Cembella, A. D. (eds), Manual on harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides n° 33, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris, pp. 81–94.
18. Rodríguez, E. M., Acero, J. L., Spoof, L., Meriluoto, J. (2008). “Oxidation of MC-LR and RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products.” *Water Research*, 42, 1744-1752p.
19. Sako, Y., Yoshida, T., Uchida, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Ishida, Y. (2000). “Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2+3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (Dinophyceae).” *Journal of Phycology*, 37, 1044-1051.
20. Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R., Eaglesham, G. (2000). “Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination”. National Research Centre for Environmental Toxicology, Queensland, Australia. *Toxicon*, 38, 1203 – 1213.
21. Shimizu, Y., Yoshioka, M. (1981). “Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates.” *Science*, 212 (1), 547-549.
22. Strichartz, G. (1984). *Structural Determinants of the Affinity of Saxitoxin for Neuronal Sodium Channels – Electrophysiological Studies on Frog Peripheral Nerve*. Anesthesia Research Laboratories, Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.
23. Tao, J. e Tian-Jiu, J. (2008). “Investigation of extraction method for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish.” *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(11), 1460-1464p.
24. Teixeira, M. G. L. C., Costa, M. C. N., Carvalho, V. L. P., Pereira, M. S., Hage, E. (1993). “Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil.” *Bulletin of Pan American Health Organization*, 27 (3).
25. Vale, P (2006). “Implementação de técnicas de HPLC e LC-MS para estudo de perfis de biotoxinas marinhas em plâncton e em bivalves”. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101, 163-180p.
26. Wetzel, R. G. (2001). *Limnology – Lake and Rivers Ecosystems*. Third Edition. Academic Press. San Diego, California, USA.