

## Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) aislada de Manzanillo, Colima, México

## Presence of benzoate type toxins in a strain of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Manzanillo, Colima, Mexico

Lorena M. Durán-Riveroll,<sup>1</sup> Javier Peralta-Cruz,<sup>2</sup> José J. Bustillos-Guzmán<sup>3</sup> y Christine J. Band-Schmidt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas - Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Plancton y Ecología Marina. Av. Instituto Politécnico Nacional s/n Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz, 23096. B.C.S., México

<sup>2</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Química Orgánica. Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás. Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F. 11340. México

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. A.P. 128. La Paz, 23090. B.C.S., México  
e-mail: cbands@ipn.mx

---

Durán-Riveroll, L. M., J. Peralta-Cruz, J. J. Bustillos-Guzmán, C. J. Band-Schmidt. 2013. Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) aislada de Manzanillo, Colima, México. *Hidrobiológica* 23 (2): 169-175.

### RESUMEN

Se analizó, por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN), el extracto de una cepa de *Gymnodinium catenatum* Graham, aislada de las costas de Manzanillo, Colima, para determinar la existencia de toxinas tipo benzoato. El extracto fue fraccionado con un gradiente ascendente de metanol de 0 a 100% (v/v) por extracción en fase sólida con cartuchos LC-18 en pasos de 10%. La fracción 2 (10% metanol) exhibió dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm, correspondientes a un sistema AA'BB', que confirmó la presencia de un anillo bencénico *para* sustituido, atribuido al *p*-hidroxibenzoato en el carbono 17 del esqueleto base de la toxina. Con ello se confirmó la presencia de análogos tipo benzoato en la cepa de *Gymnodinium catenatum* proveniente de esta zona del Pacífico Mexicano, los cuales han sido poco estudiados, y el hecho de detectarlos en cepas de México es importante por el peligro potencial que representan para la salud pública. Asimismo, se generó la oportunidad de continuar estudiando estos compuestos, tanto para determinar su toxicidad en mamíferos como para, eventualmente, conocer su potencial farmacológico.

**Palabras clave:** *Gymnodinium catenatum*, toxinas paralizantes (TP), toxinas tipo benzoato, <sup>1</sup>H-RMN.

### ABSTRACT

The extract of a *Gymnodinium catenatum* strain, isolated from Manzanillo, Colima, in the Mexican Pacific coast, was analyzed by nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) to determine the presence of benzoate-type analogs. The extract was fractionated using solid-phase extraction (SPE) partitioning on a C-18 cartridge, using a stepwise gradient from 0 to 100% (v/v). Fraction 2 (10% methanol) showed two aromatic doublet signals at 7.91 and 7.53 ppm, consistent with an AA'BB' system, corresponding to a *para* substituted benzenic ring, attributed to the hydroxybenzoate moiety on C-17 of the toxin basic structure. These findings indicate the presence of benzoate type analogs in this Mexican strain. These analogs have been poorly studied, and the report on their existence in our country is of great importance because they could represent a public health risk, but in the other hand, their existence generates the opportunity to continue the research to determine their toxicity in mammals and, eventually, their pharmacological potential.

**Key words:** Benzoate type toxins, *Gymnodinium catenatum*, paralytic shellfish toxins (PST), <sup>1</sup>H-NMR.

## INTRODUCCIÓN

Las toxinas paralizantes (TP) son un grupo de alcaloides neurotóxicos. La saxitoxina (STX) es la TP más investigada hasta ahora, y, desde su descubrimiento, en 1957, se han identificado 57 análogos de ocurrencia natural en varios organismos taxonómicamente distantes, como dinoflagelados, cianobacterias, el cangrejo *Atergatis floridus* Linnaeus, el pez globo *Tetraodon cutcutia* Hamilton, y la rana dorada de Panamá *Atelopus zeteki* Dunn (Yotsu-Yamashita et al., 2004; Wiese et al., 2010), lo cual es interesante desde el punto de vista de la divergencia taxonómica (Llewellyn, 2006). En el ambiente marino, las TP son producidas por dinoflagelados; 11 especies del género *Alexandrium*, *Gymnodinium catenatum* Graham y *Pyrodinium bahamense* Plate (Landsberg, 2002). Las toxinas son transferidas en la cadena alimenticia por vectores tradicionales como bivalvos filtradores, o no tradicionales como crustáceos, gasterópodos y peces planctívoros. Estos organismos acumulan las toxinas al alimentarse de los dinoflagelados, en muchas ocasiones sin daño aparente (Wiese et al., 2010), aunque la susceptibilidad hacia las toxinas varía en función del historial de exposición; poblaciones con historial de exposición crónica parecen tener menor sensibilidad que los organismos de poblaciones que no han sido expuestas (Landsberg, 2002).

La intoxicación con TP puede resultar en un padecimiento severo y ocasionalmente fatal, conocido como envenenamiento por toxinas paralizantes (PSP, por sus siglas en inglés paralytic shellfish poisoning) (Wiese et al., 2010). El modo de acción de estas toxinas se da por el bloqueo total o parcial (en función del análogo) de los canales de sodio regulados por voltaje, los cuales han sido detectados en la membrana celular de los vertebrados y

en la mayoría de los invertebrados, incluyendo moluscos, medusas y gusanos planos (Llewellyn, 2006). Estos canales son unos de los principales canales iónicos responsables de la excitabilidad neuronal, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Krafte & Bannon, 2008), al generar el potencial de acción en las membranas (Caterall, 2000). La inhibición es mediada por la interacción entre los grupos guanidino cargados positivamente de la STX, con los grupos carboxilo con carga negativa en el sitio 1 del canal, bloqueando el poro (Wiese et al., 2010).

La mayoría de los canales de sodio en mamíferos son sensibles a la STX y por lo tanto las células neuronales en humanos y otros tejidos, son susceptibles a su acción. Actualmente se sabe que también bloquean canales de calcio y potasio, los cuales se encuentran, de igual manera, en células excitables (Llewellyn, 2006).

La STX es una molécula pequeña, con un peso molecular de 299. Presenta un sistema tricíclico que contiene dos grupos guanidino, los cuales le confieren una gran polaridad, por lo que es extremadamente estable en soluciones biológicas y fisiológicas. La STX muestra una alta solubilidad en agua, menor en alcohol y es insoluble en disolventes orgánicos (Wiese et al., 2010). Esta toxina exhibe un número sorprendente de análogos naturales, en los cuales hay variaciones en la cadena lateral carbamoil, en el nitrógeno 1 (N1) y en el carbono 11 (C11). En los análogos hidrofílicos de *G. catenatum*, las variaciones en la cadena lateral pueden ser, desde carecer de ella hasta presentar un grupo sulfato o benzoato. El N1 puede ser hidroxilado y el C11 puede albergar grupos sulfato (Llewellyn, 2006). Entre estos análogos se encuentran la STX, NeoSTX, gonyautoxina (GTX), B1, B2, C1, C2, C3, C4, decarbamoil (dc) STX, dcNeoSTX, dcGTX, entre otras

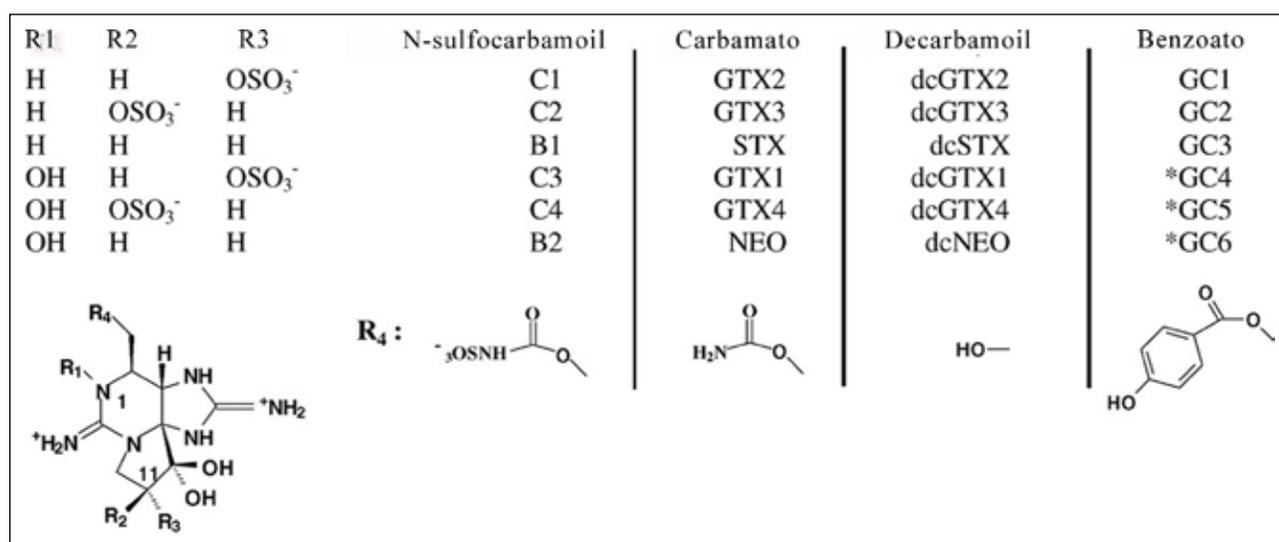


Figura 1. Estructura de las principales toxinas de dinoflagelados asociadas al síndrome de envenenamiento por toxinas paralizantes. La estructura de las toxinas marcadas con un asterisco (\*) no ha sido caracterizada (Modificada de Vale, 2008b).

(Vale, 2008b) (Fig. 1). De éstos, la STX es el análogo más potente y las de menor potencia son las toxinas B y C (Fusetani & Kem, 2009).

Tradicionalmente los análogos de STX estudiados han sido únicamente compuestos hidrofílicos. En el 2003, tres nuevos análogos "hidrofóbicos", los análogos tipo benzoato, fueron aislados de cepas australianas de *G. catenatum* como una fracción importante de las toxinas (hasta 100% en porcentaje molar en una cepa australiana), y han sido nombradas toxinas GC1, GC2 y GC3 (Negri *et al.*, 2003). Más tarde se sospechó la existencia de un mayor número de análogos: los N1-hidroxil de GC1 a GC3 (GC4 a GC6), los di-hidroxibenzoato (de GC1a a GC6a) y los sulfato-benzoato (de GC1b a GC6b) (Vale, 2008b) (Fig. 2). Es importante considerar el efecto de las toxinas tipo benzoato en la salud pública, ya que el método de monitoreo y detección de toxinas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) obvia su presencia debido a que, por su ligera hidrofobicidad, son retenidos en la resina de los cartuchos utilizados para eliminar los compuestos que causan interferencia en el análisis (Negri *et al.*, 2003). Estos análogos han sido poco estudiados debido a su reciente descubrimiento y a la falta de estándares (Vale, 2011).

Las toxinas tipo benzoato han sido reportadas en cepas de Australia, China, Japón, Portugal, España y Uruguay (Negri *et al.*, 2007) y recientemente en una cepa de Bahía Concepción, del Golfo de California, México (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2011). En este trabajo se analizó una cepa de *Gymnodinium catenatum*, aislada de las costas del Pacífico mexicano (Manzanillo, Colima, México), en la que se detectó la presencia de estas toxinas al identificar su anillo benzénico por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cultivos de una cepa de *G. catenatum* aislada de Manzanillo, Colima, México (cepa G7), inoculando una densidad inicial de 500 cél mL<sup>-1</sup> en un volumen de 1000 mL de medio GSe (Blackburn *et al.*, 2001), en matraces Erlenmeyer de 2 L, por triplicado. La temperatura del cultivo se mantuvo en 24 ± 1 °C en un régimen luz-oscuridad de 12:12, a una intensidad de 150 µmolEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. El medio de cultivo se preparó con agua de mar esterilizada por filtración, a una salinidad de 34 ups. Las vitaminas se esterilizaron por filtración y el resto de los nutrientes por calor húmedo (121 °C, 15 libras de presión durante 15 min).

Se cosecharon 50 mL de cultivo durante la etapa exponencial tardía, utilizando filtros de fibra de vidrio de 0.47 µm de tamaño de poro (Whatman GFF 24 mm). Las muestras se conservaron a -20 °C en ácido acético al 1% (v/v) hasta el momento de la extracción de las toxinas.

**Extracción de toxinas.** La extracción de toxinas se realizó aplicando dos ciclos de congelado-descongelado y sonicación (Vale, 2008a). El sobrenadante se filtró con acrodiscos de fibra de vidrio (Whatman 3.0 mm GD/X). El extracto se conservó a -20 °C hasta su fraccionamiento y posteriores análisis.

**Fraccionamiento de toxinas.** Se utilizaron cartuchos SPE LC18 (Honeywell Burdick & Jackson C-18) de 2.0 g, acondicionados con 6.0 mL de metanol y 6.0 mL de agua destilada y desionizada. Se agregó 1.0 mL del extracto y se eluyó con un gradiente ascendente de metanol de 0 a 100% (v/v) en pasos de 10% (5.0 mL cada uno). Se obtuvieron 11 fracciones (F1 = 100% H<sub>2</sub>O; F2 = 90:10 H<sub>2</sub>O:MeOH; F11 = 100% MeOH). Posterior a la fracción aislada con 100% metanol, se colectó una última fracción con 9:1 (v/v) meta-

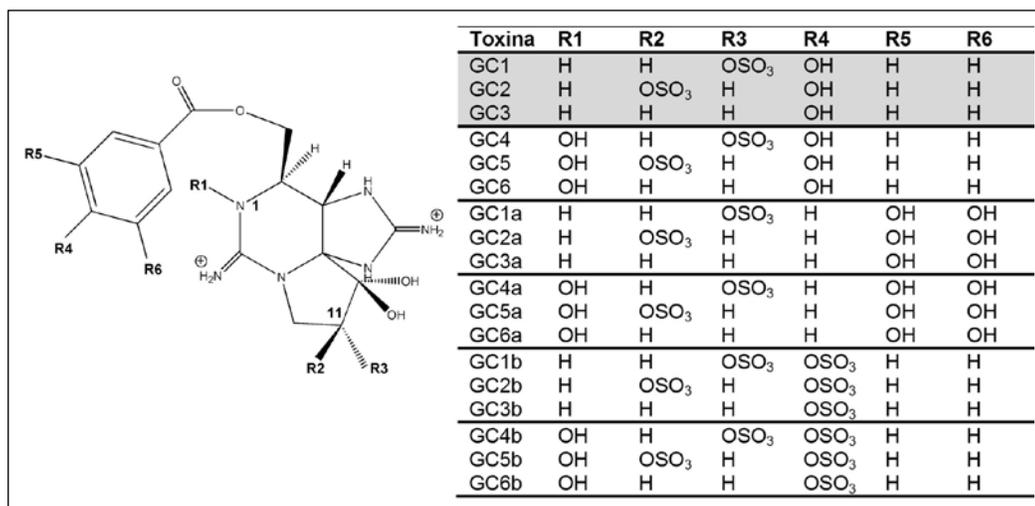


Figura 2. Análogos benzoato identificados en *G. catenatum* de acuerdo a Vale 2008b. Las estructuras resaltadas han sido determinadas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Vale (2010) ha inferido la existencia del resto de las toxinas por los pesos moleculares obtenidos mediante espectrometría de masas.

nol: ácido acético 1M (Vale, 2008b). Las 12 fracciones se secaron por liofilización y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Espectroscopía de las fracciones.** El análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), fue realizado en un espectrómetro Varian 500-MR, a  $20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó agua deuterada como disolvente. Los espectros de ultravioleta (UV) se obtuvieron con un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, en un intervalo de 200 a 500 nm.

## RESULTADOS

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la de fracción 2 (10% MeOH) exhibió una señal simple en 8.5 ppm, que corresponde a los protones de los iminos de la saxitoxina. Las dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm corresponden al sistema AA'BB', característico de un anillo bencénico *para* sustituido; estas señales se atribuyeron al grupo *p*-hidroxibenzoato en posición 6 del esqueleto base de la saxitoxina. Se observaron dos señales: en 5.16 y 4.67 ppm, parcialmente enmascaradas por la señal intensa del agua intercambiada del disolvente, de acuerdo a las atribuciones reportadas por Negri *et al.* (2003) (Fig. 3). La primera señal corresponde al protón H-5 del heterociclo base de saxitoxina acoplado al H6 y al NH vecinal; la segunda señal es atribuida al protón H11 (R2, R3 = H), acoplado al metileno H10.

Los espectros de ultravioleta de esta fracción mostraron absorciones en 254.32 y 318.94 nm, característicos de bencenos disustituidos en la posición *para*. No se observaron absorciones de ultravioleta en el resto de las fracciones (Fig. 4).

Los desplazamientos químicos observados en RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), así como el análisis ultravioleta de la fracción 2, confirmaron la presencia del heterociclo base de saxitoxina, así como la presencia de grupos *p*-hidroxibenzoato.

## DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más interesantes en la investigación de las toxinas paralizantes, ha sido el rápido descubrimiento de nuevos análogos (Vale, 2010).

En *G. catenatum* únicamente se habían reportado análogos hidrofílicos, hasta que Negri *et al.* (2003) identificaron los análogos tipo benzoato (GC), los cuales pueden ser una fracción importante de las toxinas; se han observado, en base molar, desde 1-2% en una cepa proveniente de Japón, hasta el 100% en una cepa australiana (Negri *et al.*, 2007).

A partir del aislamiento y la identificación precisa de estas toxinas por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas [cromatografía de líquidos en columna (LCC), cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de fluorescencia (HPLC-FLD), cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

preparativa, espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN) y HPLC-FLD acoplado a EM], por el grupo de trabajo de Negri, ha sido posible la identificación de los análogos tipo benzoato GC1, GC2 y GC3 en HPLC-FLD por comparación de los tiempos de retención, máxima de emisión de fluorescencia y desaparición de los picos al eliminar la oxidación post-columna, técnica utilizada posteriormente por Negri *et al.* (2007), Vale (2008a) y Bustillos-Guzmán *et al.* (2011). Vale (2008b) utilizó HPLC-FLD y HPLC-EM para reportar la existencia de otros posibles análogos como los di-hidroxi-benzoato (GC4 - GC6), benzoato N1 hidroxilados (GC1a - GC6a) y sulfato-benzoato (GC1b - GC6b) (Fig. 2).

La presencia de toxinas hidrofílicas, tanto en cepas mexicanas como en cepas de otros países, ha sido un tema ampliamente discutido e investigado. En el caso de las cepas mexicanas, Band-Schmidt *et al.* (2010) hicieron una revisión y concluyen que de manera característica, *G. catenatum* produce los análogos STX, neoSTX, GTX2-3, dcGTX2-3, B1, C1 y C2. Las toxinas decarbamoil (dcGTX2-3) y *N*-sulfocarbamoil (C1 y C2), son generalmente los análogos con mayor contribución molar, sin embargo, no se consideraron los análogos tipo benzoato en los estudios reportados en dicha revisión. Para el caso de la presencia de las toxinas benzoato, Bustillos-Guzmán *et al.* (2011), analizaron una cepa de Bahía Concepción por HPLC-FLD, después de hacer una oxidación con periodato y extracción en fase sólida en cartuchos C18. Los autores reportan la presencia de varios análogos de toxinas tipo benzoato, aunque en sentido estricto no hubo confirmación de ello, debido a que no utilizaron estándares por la falta de disponibilidad y, por lo tanto, los resultados no fueron contundentes, como al utilizar técnicas espectroscópicas o espectrometría de masas. En este análisis se llevó a cabo un fraccionamiento como el reportado por Vale (2008b), para separar los análogos tipo benzoato, y por espectroscopía se demostró la ocurrencia del grupo bencénico en una de las fracciones. Este grupo se encuentra en el carbono 17, tomando el lugar del grupo carbamoil de las toxinas carbamatadas (STX, neoSTX y GTX1 a GTX4), y su presencia caracteriza a las toxinas tipo benzoato. En conclusión, el análisis confirmó la existencia de este grupo de toxinas en otra cepa aislada de costas mexicanas y corrobora los resultados de Bustillos-Guzmán *et al.* (2011).

La existencia de análogos tipo benzoato en cepas mexicanas de *G. catenatum* es importante por diversos motivos. Uno de ellos es el peligro potencial para la salud pública, ya que, aunque aún se desconoce su toxicidad en mamíferos (*in vivo*), Llewellyn *et al.* (2004) demostraron, en un estudio realizado con sinaptosomas de cerebro de rata, que estas toxinas tienen una fuerte afinidad por los canales de sodio, menor que la saxitoxina pero similar a la de las GTX y las toxinas sulfocarbamoil. La información obtenida en el estudio arriba mencionado resalta la importancia de analizar la toxicidad de los análogos tipo benzoato *in vivo* en mamíferos, ya

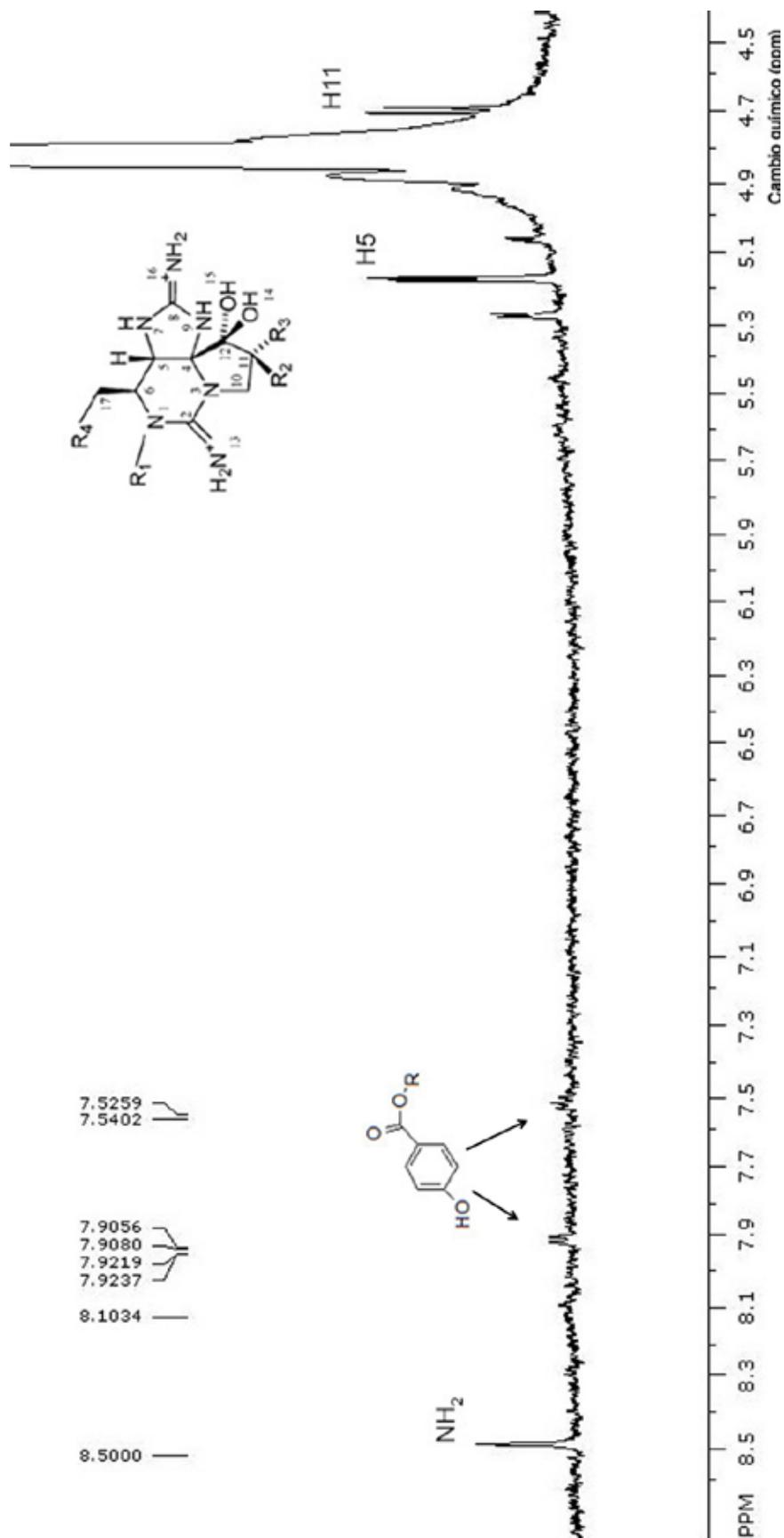


Figura 3. <sup>1</sup>H-RMN de toxinas de *Gymnodinium catenatum*, cepa G7, fracción 2 obtenida con 10% MeOH. Las dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm (sistema AA'BB'), confirmaron la presencia de un anillo bencénico *para* sustituido, atribuido al *p*-hidroxibenzoato en posición 6 del esqueleto base.

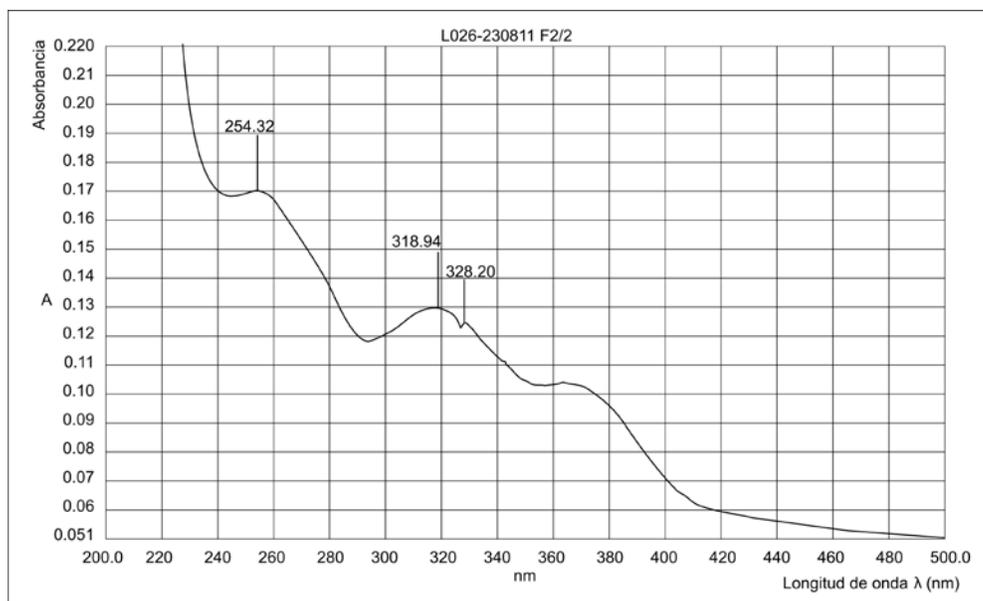


Figura 4. UV-VIS de toxinas de *Gymnodinium catenatum*, cepa G7, fracción 2 obtenida con 10% MeOH.

que la toxicidad en los organismos es el resultado de la capacidad de una toxina de ser absorbida y distribuida al sitio de acción y no sólo de provocar un efecto en un blanco farmacológico. La posesión de un grupo que disminuye su polaridad, el grupo benzoato, genera la posibilidad de que este grupo de toxinas pueda tener una mayor capacidad que la saxitoxina y otros análogos para cruzar los epitelios, y por lo tanto podrían ser absorbidos con mayor facilidad a través del tracto intestinal de los mamíferos y del epitelio vascular, lo que significa un riesgo para la salud pública (Llewellyn *et al.*, 2004). Además, esta menor polaridad podría reducir su tasa de eliminación por lo que las toxinas podrían ser retenidas por mayor tiempo en los tejidos grasos, como se ha demostrado con las brevetoxinas en estudios realizados en ratas (Llewellyn *et al.*, 2004; Poli *et al.*, 1990). Es importante mencionar que estas toxinas no son detectadas con el método de monitoreo y detección por HPLC (Negri *et al.*, 2003), y debido a que existe una tendencia creciente a abandonar los bioensayos en animales para pruebas de biotoxinas marinas, reemplazándolos por análisis químicos (Vale, 2011), aumenta el riesgo de no detectarlas. Por otro lado, Vale (2008a) demostró que en algunos bivalvos las toxinas tipo benzoato sufren, en mayor o menor proporción, una biotransformación al perder la cadena lateral que contiene al grupo benzoato por la acción de la enzima carbamoilasa, produciendo los análogos decarbamoil, probablemente de mayor toxicidad.

Otro factor de importancia en el estudio de estos nuevos análogos, es su potencial farmacológico. La STX, por su alta toxicidad, ha mostrado tener poco potencial como anestésico local en pruebas realizadas en conejo y ratón, pero gran potencial para la investigación celular, específicamente en los canales de sodio regulados por voltaje (Fusetani & Kem, 2009). Algunos derivados

de menor toxicidad, las gonyautoxinas (GTX) se han utilizado con éxito en el tratamiento de fisuras anales crónicas en humanos (Garrido *et al.*, 2007). El hecho de confirmar los análogos tipo benzoato en las cepas mexicanas genera la oportunidad de continuar con su investigación en nuestro país, tanto para determinar la toxicidad en mamíferos (modelo ratón), como para, posteriormente, conocer su potencial farmacológico.

Nuestro equipo de trabajo se encuentra realizando la identificación por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), sin embargo, la técnica de resonancia magnética nuclear ha sido eficiente para la confirmación de la existencia de un grupo benzoato *para* sustituido en nuestras muestras. Con este estudio confirmamos la existencia del grupo benzoato, aunque para identificar plenamente los análogos existentes en nuestros extractos se deberán realizar pruebas con HPLC-FLD-MS, pruebas que nos darán información acerca del peso molecular de cada toxina aislada en un determinado tiempo de retención, contribuyendo de esta manera a la identificación de cada pico en el cromatograma con su correspondiente toxina, facilitando los análisis de las toxinas por HPLC-FLD.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos institucionales SIP 2012-1152, SIP 2012-1448, SIP 2013-0942 (CICIMAR-IPN) y PC0.11 y 0.12 (CIBNOR) y el proyecto CONACyT 178227. Se agradece el apoyo de la Dra. Sonia Quijano Scheggia, por la facilitación de la cepa. Al Dr. Francisco Hernández por su asesoría técnica en la extracción y análisis de toxinas paralizantes, al Dr. Paulo Vale por su asesoría en la detección de toxinas tipo benzoato y a los revisores que ayu-

daron a mejorar el manuscrito. Christine J. Band-Schmidt y Javier Peralta-Cruz son becarios de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas y de Estímulos al Desempeño de los Investigadores del Instituto Politécnico Nacional. Lorena M. Durán-Riveroll es becaria PIFI y CONACyT, número de beca 65354.

## REFERENCIAS

- BAND-SCHMIDT, C. J., J. J. BUSTILLOS-GUZMÁN, D. J. LÓPEZ-CORTÉS, I. GÁRATE LIZÁRRAGA, E. J. NÚÑEZ-VÁZQUEZ & F. E. HERNÁNDEZ-SANDOVAL. 2010. Ecological and Physiological Studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A Review. *Marine Drugs* 8: 1935-1961.
- BLACKBURN, S. I., C. J. BOLCH, K. A. HASKARD & G. M. HALLEGRAEFF. 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia* 40 (1): 78-87.
- BUSTILLOS-GUZMÁN, J. J., P. VALE & C. J. BAND-SCHMIDT. 2011. Presence of benzoate type toxins in *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from the Mexican Pacific. *Toxicon* 57: 922-926.
- CATERALL, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
- FUSETANI, N. & W. KEM. 2009. Marine toxins as research tools. *Progress in Molecular and Subcellular Biology, Marine Molecular Biotechnology* 46. Springer-Verlag, Heidelberg. 259 p.
- GARRIDO, R., N. LAGOS, M. LAGOS, A. J. RODRÍGUEZ-NAVARRO, G. GARCÍA, D. TRUAN & A. HENRIQUEZ. 2007. Treatment of chronic anal fissure by gonyautoxin. *The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. Colorectal Disease* 9: 612-624.
- KRAFTE, D. S. & A. W. BANNON. 2008. Sodium channels and nociception: recent concepts and therapeutic opportunities. *Current Opinion in Pharmacology* 8: 50-56.
- LANDSBERG, J. H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10: 113-390.
- LLEWELLYN, L. E. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports* 23: 200-222.
- LLEWELLYN, L., A. NEGRI & M. QUILLIAM. 2004. High affinity for the rat brain sodium channel of newly discovered hydroxybenzoate saxitoxin analogues from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 43: 101-104.
- NEGRI, A., D. STIRLING, M. QUILLIAM, S. BLACKBURN, C. BOLCH, I. BURTON, G. EAGLESHAM, K. THOMAS, J. WALTER & R. WILLIS. 2003. Three novel Hydroxybenzoate Saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology* 16: 1029-1033.
- NEGRI, A. P., C. J. S. BOLCH, S. GEIER, D. H. GREEN, T. G. PARK & S. I. BLACKBURN. 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 6: 774-780.
- POLI, M. A., C. B. TEMPLETON, W. L. THOMPSON, J. F. HEWETSON. 1990. Distribution and elimination of Brevetoxin Pb Tx-3 in rats. *Toxicon* 28: 903-910.
- VALE, P. 2008a. Fate of Benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1190: 191-197.
- VALE, P. 2008b. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poison compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1195: 85-93.
- VALE, P. 2010. New Saxitoxin analogues in the marine environment: Developments in toxin chemistry, detection and biotransformation during the 2000s. *Phytochemistry Reviews* 9: 525-535.
- VALE, P. 2011. Hydrolysis of Hydroxybenzoate Saxitoxin analogues originating from *Gymnodinium catenatum*. *Food Chemistry* 125: 1160-1165.
- WIESE, M., P. M. D'AGOSTINO, T. K. MIHALI, M. C. MOFFITT & B. A. NEILAN. 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8: 2185-2211.
- YOTSU-YAMASHITA, M. Y. H. KIM, S. C. DUDLEY, G. CHOUDHARY, A. PFAHNL, Y. OSHIMA & J. W. DALY. 2004. The structure of Zetekitoxin AB, a Saxitoxin analog from the panamanian golden frog *Atelopus zeteki*: A potent sodium-channel blocker. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 4346-4351.

Recibido: 20 de agosto de 2012.

Aceptado: 05 de enero de 2013.