



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Carmen López Rodríguez**

**Estudio de la detoxificación en entornos acuáticos para la eliminación de decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), mediante el empleo de nanopartículas magnéticas**

**Estudo da detoxificación en contornos acuáticos para a eliminación de decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), mediante o emprego de nanopartículas magnéticas**

**Study of detoxification in aquatic environments for the elimination of decarbamoylsaxitoxin (dcSTX), using magnetic nanoparticles**

Traballo Fin de Grao

*Junio 2024*

## Licencia

---

Esta obra pertenece a Carmen López Rodríguez, y está sujeta a la licencia Reconocimiento Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.



# Índice

---

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN, RESUMO, ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
RESUMEN .....	7
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
1.1.    FLORACIONES DE ALGAS.....	12
1.2.    BIOTOXINAS MARINAS .....	13
1.2.1. <i>Toxinas PSP en agua dulce</i> .....	15
1.3.    MÉTODOS DE DETOXIFICACIÓN DE LAS TOXINAS PSP.....	16
1.3.1. <i>Introducción de materiales ecológicos</i> .....	16
1.4.    TOXINAS PARALIZANTES (PSP) .....	17
1.5.    MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS TOXINAS PSP .....	21
1.5.1. <i>HPLC-FLD</i> .....	21
1.5.2. <i>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i> .....	22
1.5.3. <i>Electroforesis capilar</i> .....	23
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1.    REACTIVOS.....	25
3.2.    PARTÍCULAS NANOESTRUCTURADAS.....	25

3.3.	MÉTODO DE LAWRENCE .....	26
3.3.1.	<i>Oxidación con peróxido de hidrógeno</i> .....	28
3.3.2.	<i>Intervalo de calibrado</i> .....	28
3.4.	OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES .....	29
3.4.1.	<i>Estudio del material de membrana de los filtros</i> .....	29
3.4.2.	<i>Estudio del material usado en los tubos de centrifuga</i> .....	29
3.4.3.	<i>Repetibilidad</i> .....	30
3.5.	EXPERIMENTOS CON PARTÍCULAS .....	30
3.5.1.	<i>Selección de las partículas más eficaces para la eliminación de dcSTX</i> .....	30
3.5.2.	<i>Determinación de la eficacia de las partículas en aguas naturales</i> .....	30
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS.....	32
4.1.1.	<i>Selección del material de membrana de los filtros</i> .....	32
4.1.2.	<i>Selección del material de los tubos</i> .....	33
4.1.3.	<i>Repetibilidad del método HPLC-FLD</i> .....	36
4.2.	SELECCIÓN DE LAS MEJORES PARTÍCULAS PARA ELIMINAR DCSTX DEL AGUA .....	37
4.3.	EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE LA PARTÍCULA P1-PAN EN AGUAS NATURALES	40
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>46</b>

## Índice de figuras

Figura 1. <i>Estructura de la decarbamoilsaxitoxina (dcSTX)</i> .....	15
Figura 2. <i>Estructura general de las toxinas PSP: la STX y sus análogos. Figura obtenida del trabajo de V. Rey (53).</i> .....	18
Figura 3. <i>Gráfica que relaciona el gradiente binario con el tiempo.</i> .....	27
Figura 4. <i>Esquema que ilustra el proceso de potabilización del agua en la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) de Lugo, España.</i> .....	31
Figura 5. <i>Diagrama que representa la pérdida de toxina en porcentaje causada por los distintos materiales de los filtros tras la centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos. NM, nylon modificado; AC, acetato de celulosa.</i> .....	33
Figura 6. <i>Gráfico que representa la pérdida de dcSTX en porcentaje debida al material del tubo con respecto a la concentración inicial, tras el transcurso de 2 horas en agitación a 23 rpm. P1, prueba 1; P2, prueba 2.</i> .....	36
Figura 7. <i>Gráfico que representa la cinética de la adsorción de dcSTX de los ocho tipos de partículas nanoestructuradas. Para cada una, se mantuvieron tres partículas en agitación durante 2 horas, se tomó una muestra a los 10, 30, 60 y 120 minutos, en 4,5 mL de una disolución de 30 µg/L de dcSTX en agua Milli-Q.</i> .....	39
Figura 8. <i>Diagrama que representa la adsorción de dcSTX a los 120 minutos de los ocho tipos de partículas nanoestructuradas. Para cada una, se mantuvieron tres partículas en agitación durante 2 horas, se tomó una muestra a los 10, 30, 60 y 120 minutos, en 4,5 mL de una disolución de 30 µg/L de dcSTX en agua Milli-Q.</i> .....	39
Figura 9. <i>Diagrama que compara los resultados del porcentaje de adsorción de P1-Pan en una disolución de 30 µg/L de dcSTX en agua Milli-Q con el porcentaje de adsorción de la misma partícula en una disolución de 30 µg/L de dcSTX en agua natural.</i> .....	42

## Índice de tablas

Tabla 1. <i>Resumen de las características de las principales ficotoxinas.</i> .....	14
Tabla 2. <i>Toxicidad relativa de la STX y sus análogos propuestos por la EFSA y en los canales de sodio Nav1.2 y Nav1.6 en células humanas.</i> .....	20
Tabla 3. <i>Características y composición de las nanopartículas utilizadas.</i> .....	26
Tabla 4. <i>Descripción en porcentaje del gradiente binario.</i> .....	27
Tabla 5. <i>Características de la recta patrón realizada antes de cada experimento.</i> .....	28
Tabla 6. <i>Resultados obtenidos del estudio del material de membrana de los filtros.</i> ....	33
Tabla 7. <i>Resultados obtenidos del estudio del material de los tubos.</i> .....	35
Tabla 8. <i>Resultados de la medición de 10 muestras de dcSTX de 20 µg/L para la evaluación de la repetibilidad.</i> .....	37
Tabla 9. <i>Resultados de la adsorción de las tres mejores partículas nanoestructuradas con n=6.</i> .....	40
Tabla 10. <i>Resultados de la evaluación de la adsorción de P1-Pan en agua Milli-Q y en agua natural.</i> .....	41

## Resumen, resumo, abstract

---

### Resumen

La proliferación de floraciones de algas, que incluyen cianobacterias nocivas y dinoflagelados, conlleva al incremento de toxinas perjudiciales tanto en ecosistemas marinos como en entornos de agua dulce, lo cual tiene repercusiones directas en la salud humana. Entre las toxinas producidas por estas microalgas se encuentran las PSP, unas de las neurotoxinas más potentes, responsables del síndrome paralizante por moluscos. Si bien existe una normativa europea de las PSP en alimentos marinos, no hay una regulación vigente en agua dulce. Recientemente, en España, se han detectado toxinas PSP en masas de agua dulce. Los sistemas de tratamiento del agua presentes en las estaciones potabilizadoras no son suficientes para la eliminación de estas toxinas y no hay datos sobre los efectos crónicos de la exposición a toxinas PSP. Por tanto, incluso la presencia de bajas concentraciones en el agua de consumo humano podría presentar un problema notable.

En el presente trabajo, se presenta un método de detoxificación del agua dulce mediante el empleo de nanopartículas magnéticas. Se utilizaron ocho tipos de partículas nanoestructuradas fabricadas con alginato de sodio y magnetita, junto con diferentes materiales adsorbentes como el carbón activo, el grafeno, el carbón mesoporoso CMK3 y la pectina esterificada. Se evaluó la eficacia de las partículas para la detoxificación de decarbamoilsaxitoxina (dcSTX) en disolución acuosa. Los resultados obtenidos sugieren que las partículas de carbón activo son eficientes en la eliminación de la dcSTX del agua dulce. A pesar de que este nuevo método se presenta como eficaz e innovador para eliminar toxinas PSP del agua, es necesario seguir investigando para mejorarlo.

**PALABRAS CLAVE:** decarbamoilsaxitoxina (dcSTX); nanopartículas magnéticas; detoxificación; agua dulce; síndrome paralizante por moluscos (PSP).

## Resumo

A proliferación de floracións de algas, que inclúen cianobacterias nocivas e dinoflaxelados, conleva ao incremento de toxinas prexudiciais tanto en ecosistemas mariños como en contornos de auga doce, o cal ten repercusións directas na saúde humana. Entre as toxinas producidas por estas microalgas atópanse as PSP, unhas das neurotoxinas máis potentes, responsables da síndrome paralizante por moluscos. Aínda que existe unha normativa europea das PSP en alimentos mariños, non hai unha regulación vixente en auga doce. Recentemente, en España, detectáronse toxinas PSP en masas de auga doce. Os sistemas de tratamento da auga presentes nas estacións potabilizadoras non son suficientes para a eliminación destas toxinas e non hai datos sobre os efectos crónicos da exposición a toxinas PSP. Por tanto, inclusive a presenza de baixas concentracións na auga de consumo humano podería presentar un problema notable.

No presente traballo, preséntase un método de detoxificación da auga doce mediante o emprego de nanopartículas magnéticas. Utilizáronse oito tipos de partículas nanoestructuradas fabricadas con alginato de sodio e magnetita, xunto con diferentes materiais adsorbentes como o carbón activo, o grafeno, o carbón mesoporoso CMK3 e a pectina esterificada. Avaliouse a eficacia das partículas para a detoxificación de decarbamoilsaxitoxina (dcSTX) en disolución acuosa. Os resultados obtidos suxiren que as partículas de carbón activo son eficientes na eliminación da dcSTX da auga doce. A pesar de que este novo método preséntase como eficaz e innovador para eliminar toxinas PSP da auga, é necesario seguir investigando para melloralo.

**PALABRAS CHAVE:** decarbamoilsaxitoxina (dcSTX); nanopartículas magnéticas; detoxificación; auga doce; síndrome paralizante por moluscos (PSP).

## Abstract

The proliferation of algal blooms, including harmful cyanobacteria and dinoflagellates, leads to an increase in harmful toxins in both marine ecosystems and freshwater environments, with direct implications for human health. Among the toxins produced by these microalgae are PSP, one of the most potent neurotoxins responsible for paralyzing shellfish syndrome. While there is a European regulation of PSP in marine seafood, there is no regulation in force in freshwater. Recently, in Spain, PSP toxins have been detected in freshwater bodies. The water treatment systems present in drinking water treatment plants are not sufficient for the elimination of these toxins and there are no data on the chronic effects of exposure to PSP toxins. Therefore, even the presence of low concentrations in drinking water might represent a significant problem.

In the present work, a method of freshwater detoxification using magnetic nanoparticles is presented. Eight types of nanostructured particles made of sodium alginate and magnetite were used together with different adsorbent materials such as activated carbon, graphene, mesoporous carbon CMK3 and esterified pectin. The efficacy of the particles for the detoxification of decarbamoylsaxitoxin (dcSTX) in aqueous solution was evaluated. The results obtained suggest that the activated carbon particles are efficient in removing dcSTX from freshwater. Although this new method is presented as effective and innovative for removing PSP toxins from water, further research will be needed.

**KEY WORDS:** decarbamoylsaxitoxin (dcSTX); magnetic nanoparticles; detoxification; freshwater; paralytic shellfish syndrome (PSP).

## Abreviaturas

---

AC	Acetato de celulosa
AcH	Ácido acético glacial
ANOVA	Analysis of variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASP	Intoxicación amnésica por moluscos
AZA	Azaspirácido
BTX	Brevetoxina
CFP	Intoxicación por ciguatera
CTX	Ciguatoxina
DA	Ácido domoico
dcGTX	Decarbamoilgonyautoxina
dcneoSTX	Decarbamoilneosaxitoxina
dcSTX	Decarbamoilsaxitoxina
DSP	Intoxicación diarreica por moluscos
DTX	Dinofisistoxina
EFSA	European Food Safety Authority
ETAP	Estacionamiento de Agua Potable
FAN	Floraciones de algas nocivas
GTX	Gonyautoxina

HILIC-MS/MS	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica acoplada a espectrometría de masas en tándem
HPLC-FLD	Cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia
LC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
MQ	Milli-Q
MBA	Bioensayo en ratón
Na <sub>v</sub>	Canal de sodio dependiente de voltaje
NM	Nylon modificado
NSP	Intoxicación neurotóxica por moluscos
OA	Ácido okadaico
PCOX	Oxidación post-columna
PreCOX	Oxidación pre-columna
PSP	Intoxicación paralítica por moluscos
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SD	Desviación estándar
SM	Vianda de molusco bivalvo
TEF	Factor de toxicidad equivalente
UE	Unión Europea
YTX	Yesotoxina

# 1. Introducción

---

## 1.1. Floraciones de algas

Las floraciones de algas son fenómenos producidos por la proliferación masiva de fitoplancton en aguas dulces o saladas, formando manchas coloreadas. Dado que existen floraciones de color marrón, naranja o incluso verde, dependiendo del organismo que prolifere, el término “mareas rojas” para referirse a estas puede inducir a error. Solo algunas especies de fitoplancton pueden producir biotoxinas dañinas y se conocen como floraciones de algas nocivas (FAN) (1, 2).

Las mareas rojas ocurren durante la primavera, donde la capa de agua que recibe luz solar, la región fótica, experimenta una mayor incidencia de la luz solar, y, por tanto, un aumento masivo de la biomasa de fitoplancton. Existen otros factores que favorecen la aparición de las floraciones de algas, tales como: la alteración de nutrientes (eutrofización), el nivel de oxígeno, la salinidad y otros factores ambientales.

El aumento de la temperatura producido por el cambio climático provoca aguas más cálidas, tormentas y sequías muy intensas y una reducción del manto de nieve. Como consecuencia de las lluvias intensas, las plantas ven reducida su capacidad para absorber nutrientes debido al estrés que les produce. Además, el agua de escorrentía, aquella que no se absorbe y se mantiene en la superficie de la tierra, es transportada hacia aguas superficiales pudiendo contaminarlas. Por tanto, el cambio climático y la contaminación por nutrientes provocan que las FAN duren más tiempo, sean más frecuentes y alcancen mayores superficies (3).

Las principales especies de fitoplancton que provocan las floraciones de algas nocivas son las diatomeas, los dinoflagelados y las cianobacterias. Entre estas especies, los dinoflagelados, son los organismos responsables de la producción de la mayoría de las toxinas marinas. Sin embargo, existen miles de especies, y tan solo unas pocas son potencialmente tóxicas (4). Su proliferación conlleva riesgos importantes para la calidad del agua, la salud humana y para las especies pelágicas, aquellas que habitan cerca de la superficie o en aguas medias.

Por un lado, los dinoflagelados y las diatomeas tienen un impacto negativo sobre la salud humana a través del consumo de moluscos bivalvos, que se alimentan de estas especies de fitoplancton y retienen las toxinas durante largos periodos de tiempo. Como resultado se producen los principales síndromes de intoxicación humana por molusco: intoxicación parálitica por molusco (PSP), intoxicación amnésica por molusco (ASP), intoxicación neurotóxica por molusco (NSP), intoxicación por ciguatera (CFP) e intoxicación diarreica por molusco (DSP). Por otro lado, las cianotoxinas contaminan el agua potable y afectan a la salud humana a través de la neurotoxicidad o hepatotoxicidad (1, 5).

## 1.2. Biotoxinas marinas

Las biotoxinas marinas, también llamadas ficotoxinas, son compuestos tóxicos producidos por diversas especies de microalgas marinas (6). Los dinoflagelados son los responsables de la producción de la mayoría de estas toxinas, aunque algunas diatomeas y cianobacterias también están implicadas en su generación (7). Las ficotoxinas se clasifican según su estructura química y mecanismo de acción en varios grupos, cada uno de ellos con una toxina representativa y varios análogos (6). En la Tabla 1 se resumen las características de las principales ficotoxinas.

Las ficotoxinas se acumulan principalmente en los moluscos bivalvos, lo que provoca que, la ingesta de grandes cantidades de los mismos, pueda producir intoxicaciones graves en el consumidor. Por otro lado, las toxinas causan grandes pérdidas económicas en la industria pesquera y acuífera, y, además, afectan a los ecosistemas, provocando muertes en los peces que comprometen la salud pública. En consecuencia, se ha establecido una legislación europea estricta y se han puesto en marcha protocolos de seguimiento para determinar sus límites máximos legales en los productos marinos (8, 9).

Las toxinas marinas pueden ser lipofílicas o hidrofílicas dependiendo del grado de solubilidad. Algunas de las biotoxinas marinas lipofílicas son el ácido okadaico (OA o toxina diarreica), las yesotoxinas (YTX), las ciguatoxinas (CTX), las brevetoxinas (BTX o toxina neurotóxica), las iminas cíclicas o los azaspirácidos (AZA). Por otro lado, las toxinas hidrofílicas comprenden tres grupos, saxitoxinas (STX o toxina paralizante), tetrodotoxinas (TTX) y ácido domoico (DA o toxina amnésica) (3, 10).

Tabla 1. Resumen de las características de las principales ficotoxinas.

Grupo	Toxina representante	Mecanismo de acción	Síntomas principales	Límites legales en la UE	
Hidrofilicas	Toxinas paralizantes	Saxitoxina (STX)	Bloquean los canales de sodio dependientes de voltaje (11)	Parálisis, mareos, dolor de cabeza, paro respiratorio (11)	0,8 mg/kg SM (12)
	Toxinas amnésicas	Ácido domoico (DA)	Activan los receptores ionotrópicos neuronales del glutamato (13)	Náuseas, diarrea, confusión, convulsiones, coma (14)	20 mg/kg SM (12)
	Tetrodotoxinas	Tetrodotoxina (TTX)	Inhiben los canales de sodio dependientes de voltaje (15)	Parestesia, parálisis, insuficiencia respiratoria, arritmia (16)	*
	Yesotoxinas	Yesotoxina (YTX)	Actúan sobre numerosos mecanismos celulares (17)	Modifican la absorción intestinal y tienen efectos importantes sobre el corazón (18)	1 mg Eq/kg SM# (12)
	Azaspirácidos	Azaspirácido (AZA)	Afectan a múltiples órganos (19)	Náuseas, vómitos, diarrea (20)	0,16 mg/Eq SM (12)
Lipofílicas	Toxinas diarreicas	Ácido okadaico (OA) y dinofisistoxina (DTX)	Inhiben la fosfatasa de serina/reonina 1, 2A y 3 (2)	Diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal (21)	0,16 mg Eq/kg SM (12)
	Ciguatoxinas	Ciguatoxina (CTX)	Activan los canales de sodio dependiente de voltaje (22)	Diarrea, náuseas, parestesia, dolor de cabeza, alodinia fría (23)	**
	Neurotoxinas	Brevetoxina (BTX)	Activan los canales de sodio dependientes de voltaje (24)	Vómitos, diarrea, parálisis, dilatación de pupilas (25)	***
	Iminas cíclicas	Gymnodimias y espirólidos	Inhiben los receptores nicotínicos de acetilcolina (26)	No se han reportado intoxicaciones humanas (27)	No regulada (28)

\*La EFSA considera segura una concentración por debajo de 0,044 mg Eq/kg SM (29)

\*\*No se pueden comercializar productos de pesca con CTX en la UE (30)

\*\*\*No hay datos para sacar conclusiones sobre los niveles de BTX permitidos en moluscos (31).

#Las unidades se refieren a miligramos de equivalentes de la toxina correspondiente por kilogramo de vianda de molusco bivalvo.

### 1.2.1. Toxinas PSP en agua dulce

Las FAN en agua dulce se atribuyen principalmente a la proliferación de cianobacterias (32), que junto con los dinoflagelados, son capaces de producir toxinas PSP (33). El ecosistema acuático se ve afectado por las toxinas que producen las cianobacterias, causando efectos perjudiciales en peces, algunas especies de invertebrados y otros organismos filogenéticamente inferiores (34). Existe una regulación oficial para las PSP en agua de mar, pero los datos para estas toxinas en agua dulce son escasos (35).

Las PSP se acumulan en alimentos como los moluscos, los cuales filtran grandes volúmenes de agua. Sin embargo, el riesgo de exposición a estas toxinas mediante la ingesta de moluscos de agua dulce es bajo, dado que estos no suelen ser utilizados para el consumo humano. Por tanto, las vías más probables de exposición a las toxinas cianobacterianas incluyen el agua de consumo y las actividades recreativas (32).

La mayoría de las estaciones de tratamiento de agua cuentan con sistemas ineficaces para la eliminación de estas toxinas, lo que representa un riesgo para la salud pública (36). En concreto, en este estudio experimental, se propone un método para la eliminación de una de las toxinas pertenecientes al grupo de las PSP, la decarbamoilsaxitoxina (dcSTX) en agua dulce. Su estructura química se ilustra en la Figura 1.

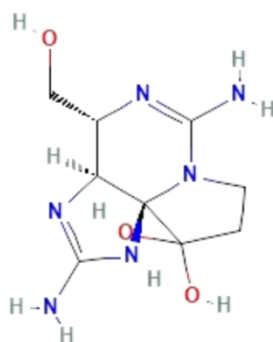


Figura 1. Estructura de la decarbamoilsaxitoxina (dcSTX)

### 1.3. Métodos de detoxificación de las toxinas PSP

El método tradicional de cloración utilizado en las plantas de tratamiento de agua no es suficiente para la eliminación de biotoxinas marinas. En su lugar, se requiere el uso de ozonización, un proceso que demanda tecnología compleja y que conlleva costes significativos. Como alternativa, están siendo objeto de investigación técnicas más económicas y sostenibles para la eliminación de estas toxinas del agua (37).

Se han analizado diversas metodologías para la eliminación de biotoxinas marinas, abarcando técnicas físicas, químicas y biológicas (38-40). En los últimos años, la nanotecnología ha emergido como un enfoque destacado para el tratamiento de agua y alimentos contaminados (41). Se han propuesto diversos adsorbentes nanoestructurados y nano reactivos para la filtración de pesticidas, metales pesados o halocarbonos en agua (42); no obstante, se ha investigado poco acerca del impacto de esta tecnología emergente en la eliminación de biotoxinas (41).

#### 1.3.1. Introducción de materiales ecológicos

El creciente uso de materiales ecológicos, renovables y biodegradables ha suscitado un interés significativo en la producción de nanomateriales. La abundancia de extractos y recursos vegetales los posiciona como uno de los principales recursos naturales para la síntesis de nanomateriales ecológicos. La celulosa, un material rentable y respetuoso con el medio ambiente, es muy demandada para el desarrollo de nuevos materiales que tienen el potencial de desplazar a los derivados del petróleo (43).

La celulosa, aislada de la pared celular de las plantas a través de procesos mecánicos, físicos y biológicos, puede transformarse en nanocristales o nanofibrillas de celulosa (44). Por otro lado, las partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) representan un material magnético de gran interés debido a su amplia variedad de aplicaciones. Por tanto, la incorporación de estas nanopartículas en matrices lignocelulósicas resulta prometedora, dado el potencial de propiedades sinérgicas que pueden surgir de su integración (45).

La incorporación de nanopartículas al proceso de eliminación de toxinas PSP tiene numerosas ventajas ya que los contaminantes y las toxinas son retiradas de la matriz líquida. La eficacia de este método depende de las nanopartículas supramagnéticas y del

campo magnético utilizado para separarlas. El campo magnético debe asegurar la extracción completa de las nanopartículas del agua desintoxicada.

Por consiguiente, la unión de nanopartículas magnéticas en una matriz de nanocelulosa daría lugar a un nuevo material con potencial para actuar de forma magnética en la descontaminación ambiental. En el presente Trabajo Fin de Grado, se propone una metodología ecológica para la eliminación de la dcSTX de agua contaminada, mediante el empleo de nanopartículas magnéticas biocompatibles, las cuales presentan una alta afinidad para unirse a una amplia variedad de toxinas. Los materiales magnéticos se basan en componentes biodegradables como la lignina y la celulosa, en nanopartículas de magnetita, biopolímeros como el alginato y la pectina y fracciones de carbono como micropartículas activadas, grafeno o carbón mesoporoso.

#### 1.4. Toxinas paralizantes (PSP)

Las toxinas pertenecientes a este grupo causan el síndrome de intoxicación paralizante por moluscos (PSP), que representa una de las intoxicaciones transmitidas por alimentos más graves y generalizadas en los humanos (46), y causan entre 50.000 y 500.000 intoxicaciones por año con una letalidad del 1,5% (47). Son neurotoxinas muy potentes producidas por varias especies de dinoflagelados, sobre todo por los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense* (48).

La toxina representante de las PSP es la Saxitoxina (STX), ya que fue la primera aislada en su forma pura de este grupo; esto sucedió en 1957 en la almeja de Alaska, *Saxidomus gigangteus* (49). Tras su descubrimiento, se han determinado en diferentes organismos más de 50 análogos de la STX (50), todos ellos son tetrahidropurinas, pero se diferencian por la combinación de residuos hidroxilo y sulfato en cuatro lugares de su estructura R1, R2, R3 y R4 (Figura 2).

Atendiendo al grupo funcional que presentan en la cadena lateral R4 se clasifican en tres subgrupos (51):

- I. Toxinas carbamoil: saxitoxinas (STX, neosaxitoxina (neoSTX)) y gonyautoxinas (GTX1-GTX4).
- II. Toxinas decarbamoil: decarbamoil-saxitoxinas (dcSTX, dcNEO) y decarbamoil-gonyautoxinas (dcGTX1-dcGTX4).
- III. Toxinas N-sulfocarbamoil: GTX5 y GTX6 y toxinas- C (C1-C4).

Recientemente, se han aislado nuevos análogos hidrófobos pertenecientes al grupo de las PSP, los cuales han sido clasificados como un nuevo subgrupo denominado toxinas-GC (52). Estos análogos presentan una cadena lateral R4 que contiene un grupo hidroxibenzoato. Sin embargo, su toxicidad aún no ha sido evaluada en profundidad (53). En la Figura 2 se muestran las estructuras y el nombre de las PSP antes mencionadas.

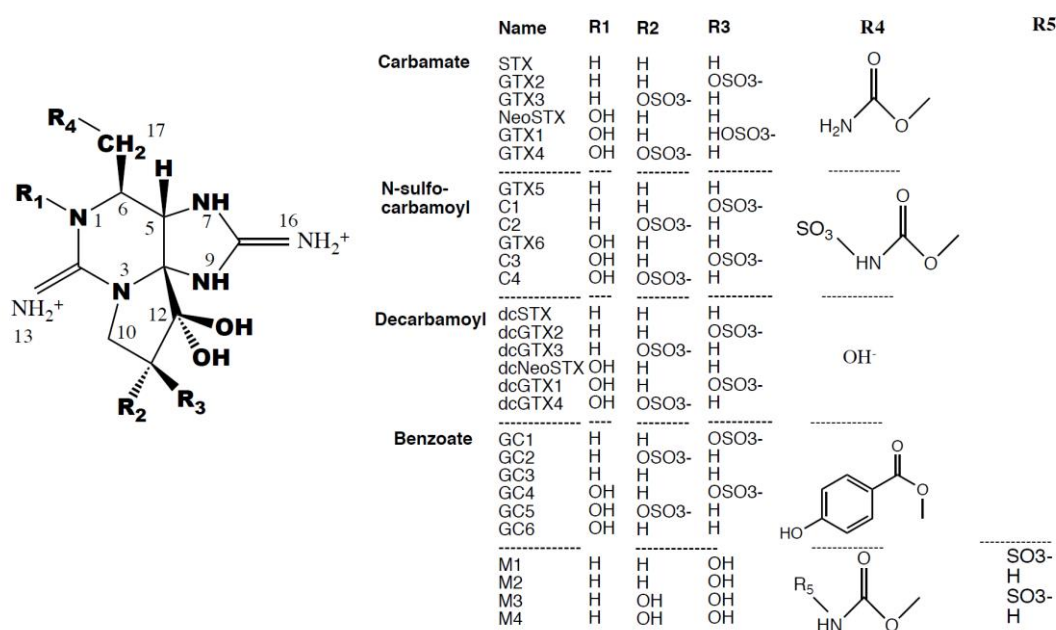


Figura 2. Estructura general de las toxinas PSP: la STX y sus análogos. Figura obtenida del trabajo de V. Rey (53).

Estas toxinas actúan sobre la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje, en concreto, sobre el sitio 1. Esto da como resultado una pérdida gradual de la función neuromuscular y, eventualmente, una parálisis muscular. Tras la ingesta de marisco contaminado y dependiendo de la gravedad de la intoxicación, los síntomas pueden ser leves o graves (54). Por un lado, en intoxicaciones leves, se incluyen síntomas como, sensación de hormigueo en boca y lengua, extremidades entumecidas, mareos y náuseas (55); por otro lado, en caso de intoxicación grave, se dan una serie de síntomas neurológicos que pueden producir una parálisis muscular y, en consecuencia, paro respiratorio, shock cardiovascular o incluso la muerte (56). Cabe destacar que no existe un tratamiento para la intoxicación por PSP específico, y no hay antídotos aprobados para su uso en humanos (57).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó los factores de toxicidad equivalentes (TEFs) para 15 toxinas PSP, basándose en la potencia relativa de los análogos de STX detectados como equivalentes de esta toxina (58). Los TEFs propuestos por la EFSA se fundamentan en el efecto de las PSP en los canales de sodio (59) y en el bioensayo en ratón (MBA) (60). El MBA fue desarrollado inicialmente para la STX y actualmente se utiliza para estimar la toxicidad de los análogos de STX (61). En consecuencia, las curvas dosis-tiempo de mortalidad son idénticas para todos los análogos (62), lo que cuestiona la validez de este ensayo para comparar los análogos de STX (61).

Dado que el mecanismo de toxicidad de las PSP implica canales de sodio dependientes de voltaje, los estudios posteriores se centraron en estos canales. No obstante, existen numerosas variaciones en la estimación de los factores de toxicidad equivalentes (61). Las diferentes isoformas de los canales de sodio se caracterizan por las diferencias de similitud en sus secuencias de aminoácidos. Su nomenclatura consiste en el símbolo del ion sodio (Na) seguido del principal regulador fisiológico (voltaje) como subíndice ( $\text{Na}_v$ ), y se enumeran del 1.1 al 1.9 según la isoforma específica del canal(63).

Una de las fuentes de los TEF de la EFSA fue el bloqueo de los canales de sodio por las PSP en cultivos neuronales primarios de ratones (59, 64). Posteriormente, se determinaron los TEF en canales  $\text{Na}_v$  humanos, específicamente, en los subtipos 1.1 a 1.7, transfectados en células HEK-293 (65). Esto proporcionó valores más precisos sobre los factores de toxicidad de las toxinas PSP. Los resultados de este estudio determinaron

que los subtipos  $Na_v1.2$  y especialmente  $Na_v1.6$ , presentaban la mejor correlación con los datos in vivo obtenidos mediante el MBA (65). Por tanto, en este Trabajo Fin de Grado, se ha decidido incluir los factores de toxicidad equivalentes de las PSP en los canales de sodios humanos  $Na_v1.2$  y  $Na_v1.6$  transfectados en células HEK-293 (65). En la Tabla 2 se detallan los TEF propuestos por la EFSA (58) y los propuestos en los canales  $Na_v1.2$  y  $Na_v1.6$  (65).

Tabla 2. Toxicidad relativa de la STX y sus análogos propuestos por la EFSA y en los canales de sodio  $Na_v1.2$  y  $Na_v1.6$  en células humanas.

Compuesto	[1, EFSA]	[2, $Na_v1.2$ ]	[2, $Na_v1.6$ ]
STX	1,00	1,00	1,00
neoSTX	1,00	2,00	1,20
GTX1	1,00	0,54	1,40
GTX2	0,40	0,40	0,15
GTX3	0,60	0,40	0,15
GTX4	0,70	0,54	1,40
GTX5	1,00	0,01	0,11
GTX6	0,10		
C2	0,10	0,01	0,09
C4	0,10		
dcSTX	1,00	0,25	0,96
dc-neoSTX	0,40	0,1	0,25
dcGTX2	0,20	0,05	0,02
dcGTX3	0,40	0,05	0,02
11-hidroxi-STX	0,30		

A la vista de los TEFs presentados en la Tabla 2, hay varias toxinas que requieren una mayor clarificación: neoSTX, GTX5 y, en particular, dcSTX, la toxina principal de este trabajo. El TEF propuesto por la EFSA para la dcSTX es de 1, mientras que los valores sugeridos en el estudio de S. Pérez y col. (64) son inferiores a los propuestos por dicha organización. Además, en numerosos estudios, el factor de toxicidad propuesto para la dcSTX no se corresponde en ningún caso con la toxicidad asignada para la STX, que se utiliza como referencia para este grupo.

## 1.5. Métodos de análisis de las toxinas PSP

Los primeros en desarrollar un método para la determinación de las toxinas PSP fueron Somer y Meyer en 1937 (60). Su ensayo se basaba en la administración intraperitoneal de la toxina y en el estudio de la relación dosis-tiempo de mortalidad en ratones. Este método, aprobado por la AOAC (66) y reconocido internacionalmente, se utiliza para determinar la toxicidad de las PSP.

No obstante, el uso del MBA presenta un problema ético debido al sacrificio de un gran número de ratones. Esta situación generó presión sobre los investigadores y organismos reguladores para desarrollar métodos alternativos.

Los métodos químicos de análisis usados para la determinación de las PSP incluyen el ensayo fluorimétrico, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia con oxidación pre- o post-columna, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) y la electroforesis capilar.

### 1.5.1. HPLC-FLD

La cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) es el método más consolidado para la detección y cuantificación de toxinas PSP (5). Las PSP poseen un cromóforo natural débil que debe ser modificado antes de la detección. En 1975, Bates y col. (67) propusieron la oxidación de toxinas PSP en disolución alcalina para formar una purina, la cual emite fluorescencia en disolución ácida, lo que se conoce como ensayo fluorimétrico. Sin embargo, este ensayo no permitía distinguir entre toxinas individuales, por lo que se implementó una separación cromatográfica antes de la detección por fluorescencia (68). La reacción de oxidación puede tener lugar tanto pre-columna (PreCOX) como post-columna (PCOX).

El método HPLC-FLD con oxidación pre-columna (PreCOX), también conocido como el método de Lawrence (69) fue aprobado como método oficial por la AOAC (70). Las toxinas se extraen de la carne del molusco homogeneizada mediante una extracción con ácido acético y se purifican con una extracción en fase sólida. Posteriormente, dependiendo de la toxina, se oxidan con peróxido de hidrógeno y/o peryodato de sodio en disolución alcalina. Los productos resultantes se separan por HPLC en fase reversa y se detectan mediante fluorescencia. Este método fue validado para la determinación de

STX; neoSTX; GTX2, 3; GTX1, 4; dcSTX; GTX5; C1, 2 y C3, 4 en mejillones, almejas, ostras y vieiras. A lo largo de los años, el método ha sufrido modificaciones para incluir otras toxinas PSP: dcNeo (71), dcGTX2, 3 (71, 72) y GTX6 (73). La modificación del método de Lawrence que utilizamos en este Trabajo Fin de Grado fue optimizado para la detección de las toxinas PSP basándose en el trabajo de V. Rey (74).

Por otro lado, como alternativa al método de Lawrence, se desarrollaron métodos HPLC-FLD que emplean oxidación post-columna (PCOX) para separar las toxinas antes de su conversión en compuestos fluorescentes. Estos métodos se fundamentan en la oxidación en línea de las toxinas, tras su elución de la columna cromatográfica, mediante un oxidante con el que se mezcla en una bobina de reacción (5). A la salida de esta bobina, se añade un ácido fuerte a la mezcla para detener la reacción y formar productos de oxidación estables para cada toxina, los cuales serán posteriormente analizados mediante FLD. En 1995, el método desarrollado por Oshima (75) consolidó la información de estudios previos sobre la oxidación post-columna, estableciendo las bases del método PCOX. Posteriormente ha sido validado por la AOAC mediante un ensayo colaborativo (76).

#### 1.5.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Los métodos de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) se están desarrollando para la confirmación de la presencia de toxinas PSP (77). La espectrometría de masas se ha establecido como una herramienta esencial en la investigación de biotoxinas marinas, gracias a su alta sensibilidad y especificidad.

En 2005 se publicó un método basado en la cromatografía líquida hidrofílica (HILIC) acoplada a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (MS/MS) (78). Este trabajo demostró una mayor sensibilidad en comparación con los métodos anteriores y representó un avance significativo en la detección de toxinas PSP (5). En los últimos años, se han propuesto diversos métodos HILIC-MS/MS para mejorar los tiempos de análisis y la matriz de la muestra. Destaca, entre ellos, un estudio en el que utilizaron HILIC-MS/MS para analizar 13 toxinas PSP, logrando un ciclo de análisis de 13 minutos (79).

### 1.5.3. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar con detección ultravioleta es un método alternativo para la detección y separación de toxinas PSP. Sus principales ventajas, en comparación con otros métodos, son los tiempos de análisis cortos, así como su alta eficiencia y resolución (68).

Este método se basa en la migración diferencial de diferentes solutos polares en un campo eléctrico dependiendo del tamaño de la molécula y de su carga. A excepción de las toxinas PSP del grupo C, que poseen carga neutra, las demás cuentan con grupos funcionales susceptibles a la protonación, lo que permite su separación en función de su estado iónico (80).

## 2. Objetivos

---

Los objetivos del presente trabajo se centran en la eliminación de dcSTX en ecosistemas de agua dulce. A pesar de que esta toxina y el grupo al que pertenece no están reguladas en este entorno, su reciente detección subraya la necesidad de mejorar los métodos de detoxificación del agua potable. Por tanto, los objetivos son los siguientes:

- Evaluación de la capacidad de adsorción de diferentes partículas magnéticas nanoestructuradas para la detoxificación de la dcSTX en agua dulce.
- Evaluación de la posibilidad de aplicarlo a muestras de agua de consumo humano.

## 3. Material y métodos

---

### 3.1. Reactivos

El estándar analítico de dcSTX  $18,7 \pm 1,6$   $\mu\text{g/g}$  proviene de Cifga S.A. (Lugo, España). El acetonitrilo 99,9% de grado HPLC y el ácido acético glacial 99,8% fueron suministrados por Panreac S.A. (Barcelona, España). El metanol 99,9% de grado HPLC fue provisto por Fisher Scientific S.L. (Madrid, España). El formiato amónico 97% es de Merck (Madrid, España). El peróxido de hidrógeno al 30% (w/w) de Scharlab S.L. (Barcelona, España). El agua se purificó mediante un sistema Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA). Los filtros para centrífuga de nylon modificado fueron suministrados por Pall Corporation (East Hills, Nueva York), los filtros para centrífuga de acetato de celulosa provienen de Corning (Nueva York, EE. UU.) y los filtros para centrífuga de polivinilideno (PVDF) son de Merck (Darmstadt, Alemania), todos ellos con un tamaño de poro de  $0,22$   $\mu\text{m}$ .

Para la preparación de las partículas nanoestructuradas se utilizaron productos de grado analítico. El polvo de carbón activado comercial se obtuvo de Panreac S.A. (Barcelona, España), el carbón activado extra puro en polvo de Merck (Darmstadt, Alemania), el carbón activado organosorb 200-1 WB en polvo lo suministró Desotec (Roeselare, Bélgica) y el negro de carbón de Cabot Corporation (Georgia, EE. UU.). El grafeno 92% y el grafeno 99% son de Graphene GreenTech (Navarra, España). Por último, el carbón mesoporoso CMK-3 proviene del grupo NanoMag (Universidade de Santiago de Compostela, España).

### 3.2. Partículas nanoestructuradas

Las partículas magnéticas nanoestructuradas de alginato sódico y magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) fueron proporcionadas por el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Santiago de Compostela (grupo NanoMag) y se sintetizaron mediante un método de coprecipitación inversa. Los códigos de las partículas y su composición en porcentaje sobre el peso total de la partícula se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 3. *Características y composición de las nanopartículas utilizadas.*

Código	Peso (mg)	Diámetro (cm)	Composición partículas		
			Alginato sódico	Magnetita	Material adsorbente
P1-Pan	3,4	0,30	34,70%	62,80%	Carbón activado Panreac (52%)
P2-PanPec	3,2	0,20	30,41%	8,76%	Carbón activado Panreac (30,41%) y pectina (24,33%)
P3-Graf92	4,3	0,20	20,60%	45,40%	Grafeno92%
P4-Graf99	6,9	0,21	23,10%	43,90%	Grafeno99%
P5-Cab	2,3	0,15	18,30%	65,40%	Carbón activado Cabot (16,30%)
P6-Des	4,5	0,22	10,90%	35,6%	Carbón activado Desotec (53,50%)
P7-Mer	2,2	0,15	36,70%	8,40%	Carbón activado Merck (30,50%) y pectina (24,40%)
P8-CMK3	1,9	0,19	8,40%	42,30%	Carbón mesoporoso CMK-3 (28,20%) y pectina (28,20%)

### 3.3. Método de Lawrence

La cuantificación de las muestras de dcSTX se llevó a cabo utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD). El HPLC, de Shimadzu, consta de un controlador (modelo CBM-20A), dos bombas (modelo LC-10AD), desgasificador (modelo DGU-14A), un detector de fluorescencia (modelo RF-10AXL), un autoinyector con regulador de temperatura y con capacidad para 70 viales (modelo SIL-20AC) y un horno para columna (modelo CTO-20AC). Para la separación cromatográfica se utilizó una precolumna Supelguard LC-18 (Supelco, Merck) con unas dimensiones de 2 cm x 4 mm de diámetro, seguida de una columna cromatográfica Supelcosil LC-18 (Supelco, Merck) de fase inversa con unas dimensiones de 15 cm x 4,6 mm de diámetro, ambas con 5 µm de tamaño de partícula.

En este Trabajo Fin de Grado hemos utilizado, para la cuantificación de dcSTX, una modificación del método de Lawrence. Es un método validado por la AOAC mediante un ensayo colaborativo (69) y fue aprobado como método oficial (81). Para la elución del producto de oxidación de la dcSTX se ha utilizado un gradiente compuesto por dos fases móviles con las siguientes características: la fase A es una disolución de formiato amónico 0,1M en agua Milli-Q y la fase B es una disolución de formiato amónico 0,1M en agua Milli-Q al 5% de acetonitrilo (ambas fases móviles ajustadas a pH 6 con AcH 0,1M). La descripción del gradiente de las dos fases con respecto al tiempo se ilustra en la Tabla 4 y en la Figura 3. El flujo es de 1 mL/min y el volumen de inyección de 25  $\mu$ L.

La temperatura del inyector es de 6°C y la del horno, se fija en 35°C. En cuanto a la longitud de onda del FLD, se establece la emisión en 395 nm y la excitación en 340 nm.

Tabla 4. Descripción en porcentaje del gradiente binario.

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
<b>Gradiente</b>	0	100	0
	5	95	5
	9	30	70
	11	100	0
	15	100	0
	18	100	0

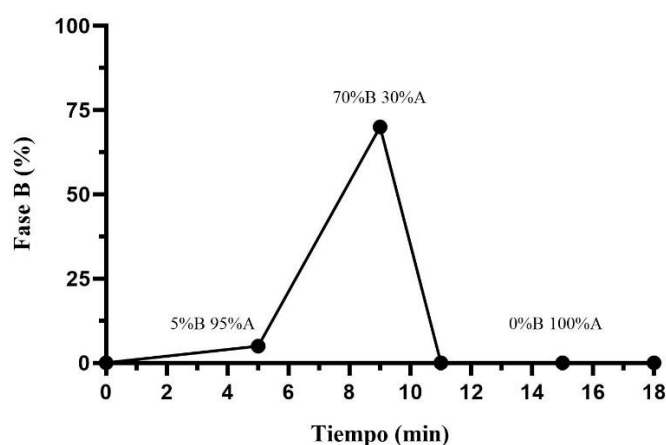


Figura 3. Gráfica que relaciona el gradiente binario con el tiempo.

### 3.3.1. Oxidación con peróxido de hidrógeno

Para la detección por fluorescencia, tanto la muestra como los patrones de dcSTX, deben ser oxidados en productos que emitan fluorescencia con peróxido de hidrógeno. Para ello, se preparó diariamente peróxido de hidrógeno al 10% en agua Milli-Q y se añadieron 25  $\mu\text{L}$  a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de muestra o de patrón y se dejaron reaccionar durante 2 minutos a temperatura ambiente; pasado este tiempo, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de AcH para parar la reacción. Por último, todas las muestras, a excepción de los patrones, fueron filtradas a través de filtros de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2. Intervalo de calibrado

Para la construcción de la recta patrón, se realizaron diluciones seriadas a partir de una disolución intermedia de 120  $\mu\text{g/L}$ . Esta recta se elaboró utilizando ocho puntos, comprendidos entre las concentraciones de 60 y 0,47  $\mu\text{g/L}$ , con un factor de dilución de 1:2. Cada punto del calibrado se preparó mediante la adición de un volumen de 120  $\mu\text{L}$  de la disolución del punto anterior. La preparación de cada punto se detalla en la Tabla 5. Cabe destacar que se confeccionó una recta de calibrado diariamente para cada experimento.

Tabla 5. Características de la recta patrón realizada antes de cada experimento.

Nombre	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Volumen $\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q ( $\mu\text{L}$ )	Volumen toxina ( $\mu\text{L}$ )
D1	60,00	120	120 (DI*)
D2	30,00	120	120 (D1)
D3	15,00	120	120 (D2)
D4	7,50	120	120 (D3)
D5	3,75	120	120 (D4)
D6	1,88	120	120 (D5)
D7	0,94	120	120 (D6)
D8	0,47	120	120 (D7)

\*Disolución intermedia de 120  $\mu\text{g/L}$  preparada a partir del stock analítico de dcSTX de  $18,7 \pm 1,6 \mu\text{g/g}$ . Se pipetea 1,54  $\mu\text{L}$  del stock de dcSTX en 240  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.

### 3.4. Optimización de los parámetros experimentales

Antes de realizar los experimentos con las distintas partículas, se evaluaron una serie de factores para optimizar las condiciones de trabajo: establecimiento del material más adecuado en los tubos con que se centrifugaban las disoluciones; establecimiento del material óptimo de las membranas de filtración; estudio de la repetibilidad.

El objetivo final para todas las condiciones evaluadas fue la selección de aquellas que supusieran una pérdida mínima de toxina, y alcanzar así una buena fiabilidad en los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia de las partículas, en donde no estuviesen afectando factores experimentales externos.

#### 3.4.1. Estudio del material de membrana de los filtros

Se probaron tres filtros de distintas marcas, cada uno con membranas de diferentes materiales. Una de las membranas era de fluoruro de polivinilideno (PVDF), otra era de acetato de celulosa y, la última, de nylon modificado. Para determinar el filtro que retuviera la menor cantidad de toxina, se preparó una disolución madre de 15 µg/L de dcSTX. Posteriormente, se pipetearon 150 µL de esta disolución en cada filtro y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. Se añadió un control (disolución madre sin filtrar) para evaluar la pérdida de toxina.

#### 3.4.2. Estudio del material usado en los tubos de centrifuga

Se evaluaron tres tipos de tubos de distintos materiales: un tubo de vidrio borosilicato 3.3 de 5 mL, un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL y un tubo de centrifuga de poliestireno de 30 mL. Para seleccionar el tubo óptimo, se preparó una disolución madre de 20 µg/L de dcSTX en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL, de la cual se transfirieron 4,5 mL a cada uno de los tubos mencionados. Posteriormente, los tubos se sometieron a agitación a 23 rpm durante dos horas, y se tomó una muestra a tiempo inicial y tras 10, 30, 60 y 120 minutos.

### 3.4.3. Repetibilidad

Para determinar la precisión de los resultados, se cuantificaron diez muestras de una disolución de dcSTX de 20 µg/L, bajo las mismas condiciones del equipo, citadas anteriormente.

## 3.5. Experimentos con partículas

### 3.5.1. Selección de las partículas más eficaces para la eliminación de dcSTX

Para determinar la capacidad de adsorción de las partículas enumeradas en la Tabla 3, se prepararon disoluciones de dcSTX a una concentración de 15 µg/L. Se pipetearon 4,5 mL de la disolución en un tubo de centrífuga de 15 mL, previamente seleccionado tal como se describe en la sección 3.4.1. A continuación, se añadieron tres partículas a cada tubo, las cuales fueron sometidas a agitación a 23 rpm durante 2 horas. Se realizaron cinco mediciones a distintos tiempos: al inicio, y a los 10, 30, 60 y 120 minutos después de añadir las partículas. La adsorción de las partículas se evaluó en términos del porcentaje de toxina que fue retirada de cada disolución en contacto con las partículas, en relación con la concentración a tiempo inicial. Las muestras que estuvieron en contacto con las partículas fueron filtradas utilizando filtros de nylon modificado de 0,22 µm, previamente seleccionado tal como se describe en la sección 3.4.2, mediante centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos. Se repitió el experimento tres veces con cada partícula.

Además, se incluyó un control (disolución de dcSTX sin partículas), que fue sometido al mismo proceso de agitación a 23 rpm durante 2 horas, y se tomó una medida tras el paso de este tiempo.

### 3.5.2. Determinación de la eficacia de las partículas en aguas naturales

Después de seleccionar la partícula más eficaz, se realizó una prueba con la misma en agua natural, proveniente de la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) de Lugo; en concreto, la muestra se recogió tras el paso del agua por los filtros de arena, antes de los filtros de carbón activo (Figura 4). Se preparó una disolución de dcSTX de 15 µg/L y se pipetearon 4,5 mL en un tubo de centrífuga de 15 mL. Posteriormente, se añadieron tres partículas a cada tubo y se colocaron en agitación a 23 rpm durante 2 horas. Se realizaron cuatro mediciones a distintos tiempos (10, 30, 60 y 120 minutos), además

de una a tiempo inicial. La adsorción de las partículas se evaluó en términos del porcentaje de toxina que fue retirada de cada disolución en contacto con las partículas, en relación con la concentración a tiempo inicial.

Dado que se utilizó agua natural, todas las muestras fueron filtradas utilizando filtros de nylon modificado de  $0,22\ \mu\text{m}$ , utilizando centrifugación durante 3 minutos a 3000 rpm. Se incluyó un control (disolución de dcSTX en agua natural sin partículas), que fue sometido al mismo proceso de agitación, y se tomó una medida al finalizar este tiempo.

Cabe destacar que la recta de calibrado para este experimento se preparó con la misma agua empleada para los experimentos, previamente filtrada con filtros de nylon modificado de  $0,22\ \mu\text{m}$ .



Figura 4. Esquema que ilustra el proceso de potabilización del agua en la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) de Lugo, España.

### 3.6. Análisis estadístico

Para el análisis del porcentaje de adsorción de dcSTX con respecto al tiempo los datos se expresaron como la media de dcSTX  $\pm$  SD (desviación estándar) del número correspondiente de experimentos. Para comparar las diferencias de medias entre los grupos y el tiempo se empleó el análisis de la varianza de una y dos variables (ANOVA) y un análisis t de Student, para evaluar la adsorción de P1-Pan en agua natural con respecto a su adsorción en agua Milli-Q. Los valores  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Las gráficas se obtuvieron con el software GraphPad Prism 8.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Optimización de las condiciones de realización de los experimentos

Se probaron diferentes tubos y filtros para evaluar la pérdida de toxina y seleccionar tanto el material de membrana óptimo para la realización de los experimentos con partículas, como el mejor material para el tubo.

#### 4.1.1. Selección del material de membrana de los filtros

Se probaron filtros fabricados con distintos materiales para determinar si se producía pérdida de toxina durante el proceso de filtración. Los filtros evaluados tenían diferentes tipos de membranas: una de nylon modificado, otra de acetato de celulosa y una de PVDF. Cada filtro contenía 150  $\mu$ L de una disolución de 15  $\mu$ g/L de dcSTX y se sometió a filtración a 3000 rpm durante 3 minutos mediante centrifugación. Se midieron dos réplicas de cada muestra, y se añadió un control (disolución sin filtrar) para evaluar la pérdida de toxina tras el filtrado. Los resultados se muestran en términos del porcentaje de toxina en disolución con relación a la concentración de la disolución sin filtrar.

Los resultados aparecen recogidos en la Tabla 6 y representados en la Figura 5 e indican una pérdida significativa de toxina en los filtros con membrana de PVDF. Por el contrario, los filtros de nylon modificado y los de acetato de celulosa mostraron pérdidas similares. Cabe destacar que los filtros de nylon mostraron un porcentaje de dcSTX en disolución ligeramente superior al de los filtros de acetato de celulosa.

Tabla 6. Resultados obtenidos del estudio del material de membrana de los filtros.

Tipo de muestra	[dcSTX] $\mu\text{g/L}$	Cantidad de toxina ( $\mu\text{g}$ ) en 0,15 mL	Porcentaje de toxina en disolución
Control sin filtro	13,60	2,04E-03	100
Filtro de nylon modificado	11,85	1,78E-03	87,13
Filtro de PVDF	1,84	2,76E-04	13,53
Filtro de acetato de celulosa	11,16	1,67E-03	82,02

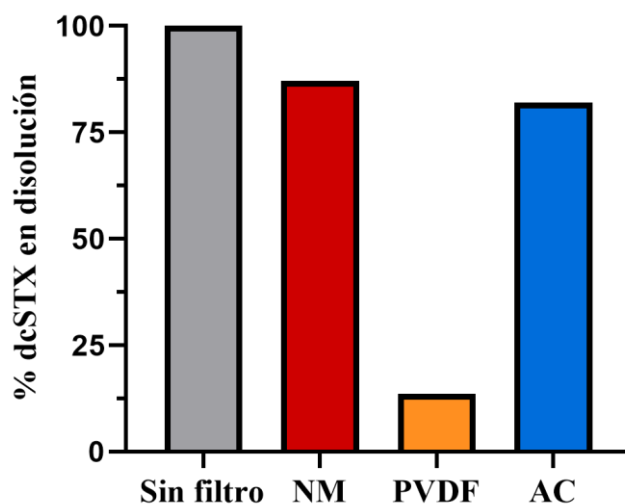


Figura 5. Diagrama que representa la pérdida de toxina en porcentaje causada por los distintos materiales de los filtros tras la centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos. NM, nylon modificado; AC, acetato de celulosa.

#### 4.1.2. Selección del material de los tubos

Se evaluaron tubos de diferentes materiales para determinar si existía pérdida de toxina tras el transcurso de 2 horas bajo agitación a 23 rpm, de acuerdo con las condiciones establecidas para los experimentos con las partículas. Se probaron tres tubos: uno de vidrio de borosilicato 3.3 de 5 mL, otro de polipropileno de 15 mL y uno de poliestireno de 30 mL. Cada tubo contenía 4,5 mL de una disolución de 20  $\mu\text{g/L}$  de dcSTX. Las

muestras se tomaron al inicio y a los 10, 30, 60 y 120 minutos y se filtraron con los filtros de nylon modificado siguiendo el mismo procedimiento que se aplicaría en los experimentos. Además, se realizó otra prueba utilizando el tubo que mostró los mejores resultados, empleando en este caso una disolución de dcSTX de 15  $\mu\text{g/L}$ , manteniendo las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados se presentan en términos del porcentaje de toxina presente en disolución con respecto a la concentración a tiempo inicial (Figura 6).

Las pruebas realizadas con los tubos de polipropileno, tanto en la primera como en la segunda prueba, no evidenciaron pérdida de toxina durante los 120 minutos del ensayo. Por otro lado, los tubos de borosilicato mostraron una pérdida significativa de toxina desde el inicio del ensayo. Finalmente, el tubo de poliestireno presentó una pérdida de toxina muy similar a la observada en los tubos de polipropileno, aunque los porcentajes de dcSTX en disolución fueron ligeramente inferiores. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 6.

Tabla 7. Resultados obtenidos del estudio del material de los tubos.

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>[dcSTX] µg/L</b>	<b>Cantidad de toxina (µg) en 0,15 mL</b>	<b>Porcentaje de toxina en disolución</b>
Tiempo inicial prueba 1	0	20,49	9,22E-02	100,00
Tubo de polipropileno	10	19,51	8,78E-02	95,20
	30	20,62	9,28E-02	100,60
	60	22,62	1,02E-01	110,39
	120	19,06	8,58E-02	93,01
Tubo de borosilicato 3.3	10	2,03	9,13E-03	9,90
	30	1,71	7,70E-03	8,35
	60	1,54	6,95E-03	7,54
	120	1,39	6,27E-03	6,80
Tubo de poliestireno	10	21,81	9,81E-02	106,43
	30	18,30	8,23E-02	89,28
	60	19,03	8,56E-02	92,84
	120	17,93	8,07E-02	87,47
Tiempo inicial prueba 2	0	15,38	6,92E-02	100,00
Tubo de polipropileno	10	15,81	7,12E-02	102,79
	30	15,84	7,13E-02	103,00
	60	14,85	6,68E-02	96,55
	120	16,31	7,34E-02	106,01

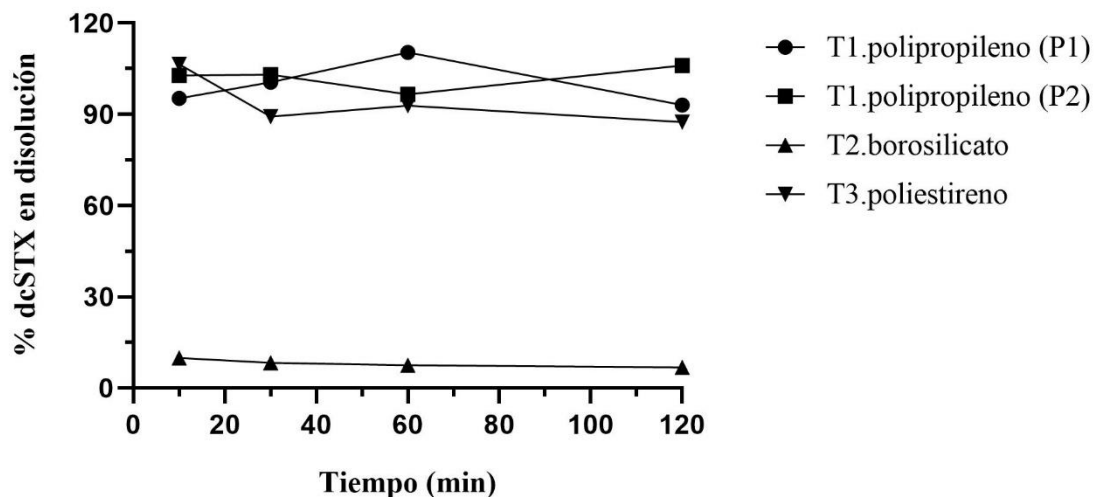


Figura 6. Gráfico que representa la pérdida de dcSTX en porcentaje debida al material del tubo con respecto a la concentración inicial, tras el transcurso de 2 horas en agitación a 23 rpm. P1, prueba 1; P2, prueba 2.

#### 4.1.3. Repetibilidad del método HPLC-FLD

Para evaluar la variación en las medidas cromatográficas, se realizó un ensayo de repetibilidad. La precisión del equipo se midió analizando 10 muestras sucesivas de una disolución de 20  $\mu\text{g/L}$  bajo las mismas condiciones. Se calculó la desviación típica de los resultados (Tabla 8) y se determinó el coeficiente de variación, obteniéndose un valor del 4,09%.

Tabla 8. *Resultados de la medición de 10 muestras de dcSTX de 20 µg/L para la evaluación de la repetibilidad.*

<b>Réplicas</b>	<b>Concentración (µg/L)</b>
R1	18,95
R2	21,05
R3	18,51
R4	19,11
R5	20,85
R6	19,14
R7	20,27
R8	19,88
R9	19,33
R10	19,03

#### 4.2. Selección de las mejores partículas para eliminar dcSTX del agua

Se evaluaron ocho partículas nanoestructuradas con diferentes características y componentes (ver Tabla 3) para la eliminación de dcSTX en agua Milli-Q. Se añadieron tres partículas nanoestructuradas a cada tubo, los cuales contenían 4,5 mL de una disolución de dcSTX a una concentración de 30 µg/L. Se seleccionó esta concentración tomando como referencia el valor orientativo considerado seguro en Australia, que es de 3 µg STX Eq/L en agua dulce, dado que no existe una regulación oficial para las toxinas PSP en agua dulce (82). Se consideró que un nivel de contaminación moderadamente alto sería diez veces superior a este valor orientativo en agua dulce. Los tubos se mantuvieron en agitación constante durante las dos horas del experimento para asegurar el contacto continuo de las partículas con la disolución. Durante el transcurso del experimento se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo, tal y como se describe en la sección 3.5.1, y la adsorción se evaluó mediante la cuantificación de la concentración de dcSTX en dichas muestras por HPLC-FLD. Además, en cada experimento se incluyeron muestras de control sometidas a las mismas condiciones del experimento, pero sin la adición de partículas. Dichos controles sin partículas nanoestructuradas no mostraron pérdida de toxina durante los experimentos. La adsorción de las partículas se evaluó en

términos del porcentaje de toxina que fue retirada de cada disolución en contacto con las partículas, en relación con la concentración a tiempo inicial (valor medio  $\pm$  SD).

Los resultados obtenidos con las ocho partículas nanoestructuradas muestran una tendencia general muy similar. La mayor parte de las partículas alcanzan un porcentaje de adsorción a los 60 minutos similar al reportado al finalizar el experimento, es decir, a los 120 minutos (Figura 7). Por otro lado, existen diferencias significativas entre P5-Cab con P2-PanPec y P4-Graf99 a los 60 minutos y con P1-Pan a los 30 y 60 minutos; entre P7-Mer con P2-PanPec y P4-graf99 a todos los tiempos, con P1-Pan, P5-Cab y P6-Des a los 30, 60 y 120 minutos y con P8-CMK3 a los 60 y 120 minutos; y entre P8-CMK3 con P2-PanPec y P3-Graf92a los 60 minutos, con P1-Pan a los 30, 60 y 120 minutos y con P4-Graf99 a los 10, 30 y 60 minutos. Se consideran estadísticamente significativos los valores con una  $p < 0,05$ .

Para evaluar la efectividad de la adsorción de las ocho partículas, se compararon los datos a los 120 minutos (Figura 8). Existen diferencias estadísticamente significativas entre P1-Pan y P2-PanPec con P3-Graf92, P4-Graf99, P7-Mer y P8-CMK3; entre P3-Graf92 con P5-Cab, P6-Des, P7-Mer y P8-CMK3; entre P4-Graf 99, P5-Cab y P6-Des con P7-Mer y P8-CMK3; y entre P7-Mer con P8-CMK3 ( $p < 0,05$ ). Se consideran estadísticamente significativos los valores con una  $p < 0,05$ .

Las tres partículas más eficientes fueron P1-Pan, P2-PanPec y P6-Des, destacándose P1-Pan y P2-PanPec. Ambas están recubiertas de carbón activo de la marca comercial Panreac como material adsorbente, diferenciándose en que P2-PanPec también contiene pectina esterificada (ver Tabla 3). P1-Pan, que cuenta con carbón activo como material adsorbente, eliminó el  $97,87 \pm 2,63$  % (media  $\pm$  SD,  $n=3$ ) de dcSTX de la disolución de  $30 \mu\text{g/L}$ , lo que equivale a  $8,35 \pm 2,52 \mu\text{g}$  de dcSTX por gramo de nanopartícula. Por otro lado, P2-PanPec, con carbón activo y pectina esterificada, eliminó  $96,68 \pm 0,65$  % de dcSTX, lo que corresponde a  $15,47 \pm 1,9 \mu\text{g}$  de dcSTX por gramo de nanopartícula.

Aunque inicialmente no se observaron diferencias significativas entre P1-Pan y P2-PanPec con P6-Des con un tamaño de muestra de  $n=3$  (Figura 8), al aumentar el número de experimentos a 6 (Tabla 9) con estas tres partículas, tanto P1-Pan como P2-PanPec mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con P6-Des.

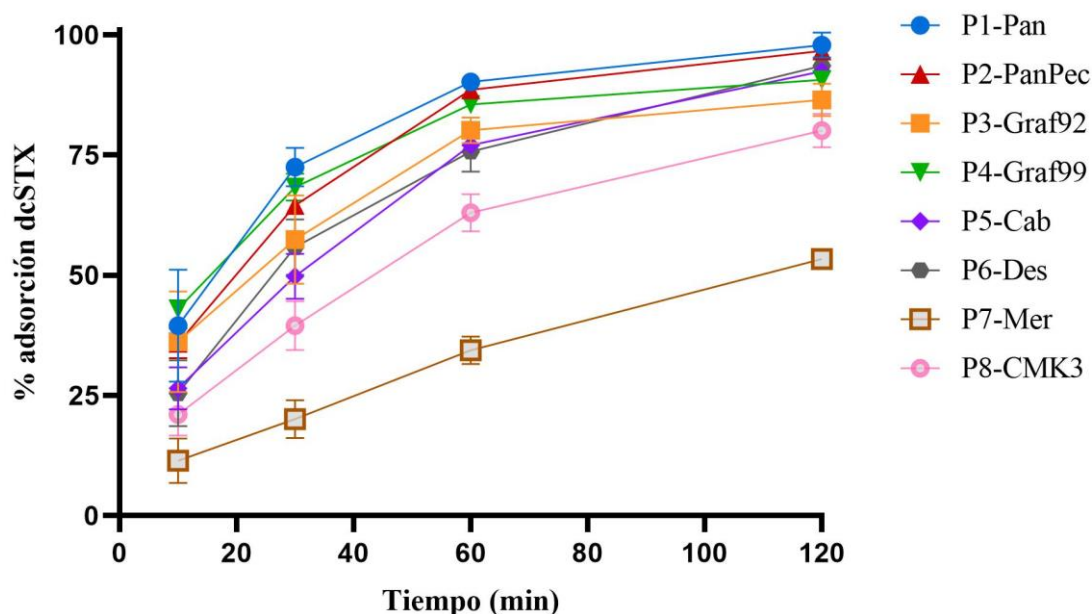


Figura 7. Gráfico que representa la cinética de la adsorción de dcSTX de los ocho tipos de partículas nanoestructuradas. Para cada una, se mantuvieron tres partículas en agitación durante 2 horas, se tomó una muestra a los 10, 30, 60 y 120 minutos, en 4,5 mL de una disolución de 30 µg/L de dcSTX en agua Milli-Q.

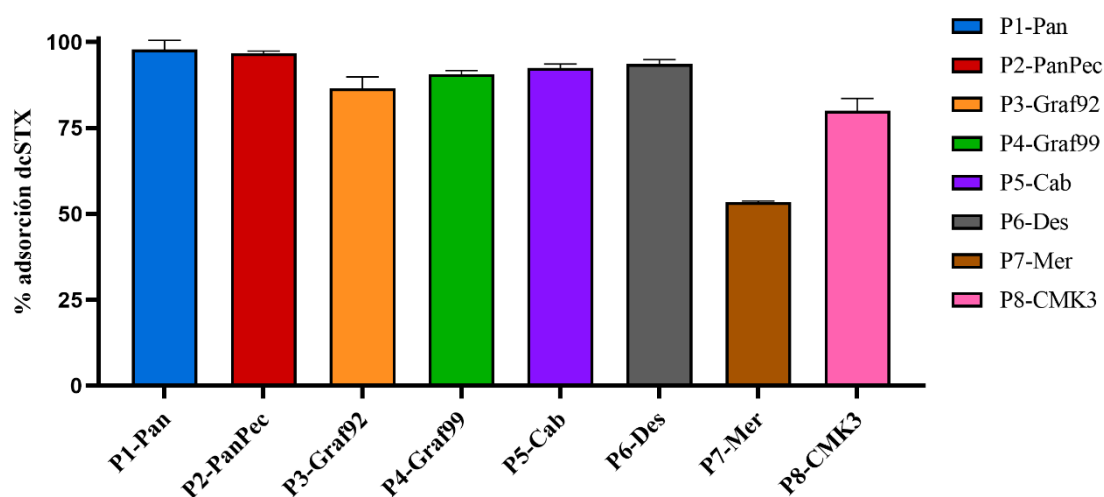


Figura 8. Diagrama que representa la adsorción de dcSTX a los 120 minutos de los ocho tipos de partículas nanoestructuradas. Para cada una, se mantuvieron tres partículas en agitación durante 2 horas, se tomó una muestra a los 10, 30, 60 y 120 minutos, en 4,5 mL de una disolución de 30 µg/L de dcSTX en agua Milli-Q.

Tabla 9. Resultados de la adsorción de las tres mejores partículas nanoestructuradas con  $n=6$ .

<b>Código partícula</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>[dcSTX] (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> de toxina en 4,5 mL</b>	<b>Porcentaje de toxina en disolución</b>	<b>Porcentaje de toxina adsorbida</b>	<b>Toxina adsorbida (<math>\mu\text{g}</math>) por g de partícula</b>
P1-Pan	0	30,10	1,35E-01	100,00	0,00	0,00
	10	18,80	8,46E-02	61,98	38,02	4,35
	30	9,20	4,14E-02	29,86	70,14	8,04
	60	3,23	1,45E-02	10,54	89,46	10,34
	120	0,64	2,87E-03	2,22	97,78	11,33
P2-PanPec	0	36,10	1,62E-01	100,00	0,00	0,00
	10	24,19	1,09E-01	66,68	33,32	5,59
	30	13,41	6,03E-02	36,86	63,14	10,64
	60	5,05	2,27E-02	13,62	86,38	14,56
	120	1,40	6,29E-03	3,82	96,18	16,27
P6-Des	0	35,80	1,61E-01	100,00	0,00	0,00
	10	25,33	1,14E-01	70,35	29,65	3,49
	30	15,81	7,12E-02	44,05	55,95	6,66
	60	8,12	3,65E-02	22,55	77,45	9,23
	120	2,30	1,03E-02	6,42	93,58	11,17

#### 4.3. Evaluación de la adsorción de la partícula P1-Pan en aguas naturales

A pesar de no haber diferencias estadísticamente significativas entre P1-Pan y P2-PanPec, se seleccionó P1-Pan debido a su porcentaje de adsorción ligeramente superior a P2-PanPec. Por lo tanto, se utilizó P1-Pan para evaluar su eficacia en agua natural procedente de la ETAP de Lugo, España. En concreto, la muestra se recogió después del paso del agua por los filtros de arena. Se hizo una disolución de dcSTX en agua natural a una concentración de 30  $\mu\text{g/L}$  y se añadieron tres partículas nanoestructuradas en cada tubo, los cuales contenían 4,5 mL de dicha disolución. Las condiciones del experimento fueron detalladas previamente, con la diferencia de que solo se tomaron muestras al inicio y a los 120 minutos. De igual modo, en cada experimento se incluyó una muestra de control sometida a las mismas condiciones, pero sin la adición de partículas nanoestructuradas.

Cabe destacar que no se observó pérdida de toxina en ninguno de los experimentos con agua natural en relación con la concentración a tiempo inicial.

Los resultados obtenidos con P1-Pan en agua natural (Figura 9 y Tabla 10) no muestran diferencias estadísticamente significativas con el porcentaje de adsorción de P1-Pan en agua Milli-Q. La partícula nanoestructurada P1-Pan demostró una eficacia del  $92,64 \pm 1,64$  % (media  $\pm$  SD, n=3) en la eliminación de dcSTX en agua natural, lo que equivale a  $10,88 \pm 1,52$   $\mu$ g de dcSTX en agua natural por gramo de nanopartícula. En comparación, en agua Milli-Q, P1-Pan eliminó el  $97,87 \pm 2,63$  % de dcSTX, correspondiente a  $11,35 \pm 0,27$   $\mu$ g de dcSTX por gramo de nanopartícula. Aunque los valores de eliminación de P1-Pan en agua Milli-Q son ligeramente superiores a los observados en agua natural, como se mencionó anteriormente, estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 10. *Resultados de la evaluación de la adsorción de P1-Pan en agua Milli-Q y en agua natural.*

<b>Nombre de la muestra</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>[dcSTX] (<math>\mu</math>g/L)</b>	<b><math>\mu</math>g de toxina en 4,5 mL</b>	<b>Porcentaje de toxina en disolución</b>	<b>Porcentaje de toxina adsorbida</b>	<b>Toxina adsorbida (<math>\mu</math>g) por g de partícula</b>
P1-Pan en agua Milli-Q	120	0,41	1,83E-03	2,13	97,87	8,35
P1-Pan en agua natural	120	2,37	1,07E-02	7,36	92,64	11,70

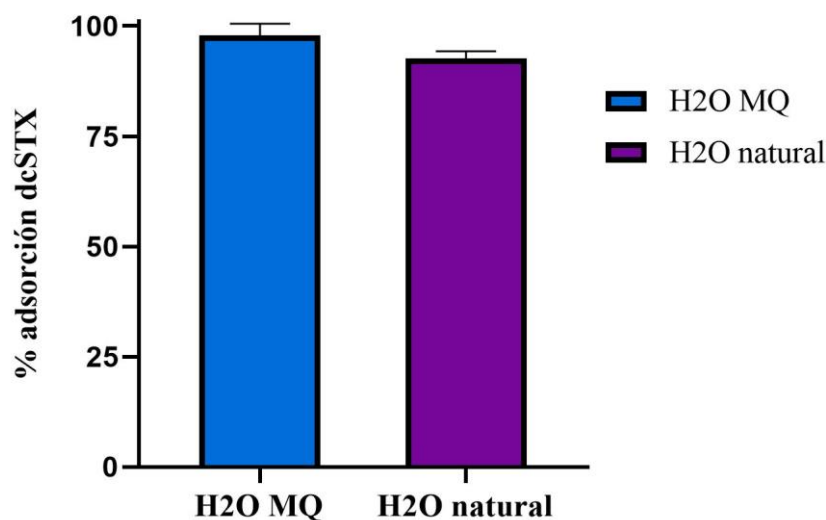


Figura 9. Diagrama que compara los resultados del porcentaje de adsorción de P1-Pan en una disolución de 30  $\mu\text{g/L}$  de dcSTX en agua Milli-Q con el porcentaje de adsorción de la misma partícula en una disolución de 30  $\mu\text{g/L}$  de dcSTX en agua natural.

## 5. Discusión

---

En este estudio se evalúa la efectividad de diversas partículas nanoestructuradas para la eliminación de dcSTX en agua dulce. En particular, se probaron ocho tipos de partículas, compuestas por distintos materiales de adsorción y en diferentes proporciones.

La dcSTX es una molécula pequeña, con una masa molecular de 329,18 g/mol, por lo tanto, se puede esperar que el tamaño de poro de las partículas no represente un impedimento para su adsorción. No obstante, las moléculas tienden a adsorberse mejor en poros cuyo tamaño sea similar al suyo, ya que aumentan los puntos de contacto entre el compuesto y el adsorbente (83). La partícula P8-CMK3 está formada en su mayor parte por mesoporos, lo que podría explicar su baja adsorción.

La estructura de la dcSTX cuenta con varios grupos amina que pueden ganar protones y, por tanto, convertirse en cationes en función del pH de la disolución. Los compuestos orgánicos catiónicos o aniónicos se vuelven más polares y se adsorben mayoritariamente por fuerzas electrostáticas (84). La STX presenta dos cargas y sus pKa son 8,24 y 11,60, valores muy similares a los de la dcSTX (85). A pH 7,05, la STX en disolución se

convierte en una mezcla de especies mono y dicatiónicas y, a un pH de 5,7, las especies son predominantemente catiónicas (84), un comportamiento que se espera de la dcSTX por tener una estructura muy parecida.

Al pH del agua Milli-Q 5,8, las partículas nanoestructuradas de carbón activado cuentan con grupos funcionales carboxilato y anhídrido que se cargan negativamente y, además, el pH al que su carga superficial es neutra, es de aproximadamente 5 (86). Por lo tanto, al pH de 5,8 con el que se trabajó en el ensayo, la carga superficial neta de las partículas de carbón activado es negativa, lo que podría favorecer la adsorción mediante la formación de uniones electrostáticas atractivas entre los grupos amina de la dcSTX y la superficie de la nanoestructura. Esto podría explicar la adsorción observada en las partículas P1-Pan, P2-PanPec, P5-Cab y P6-Des, destacándose P1-Pan y P2-PanPec. Las diferencias en términos de adsorción entre las partículas de carbón activo utilizadas pueden deberse a la presencia de diversos grupos funcionales que, a un de pH 5,8 se cargan positivamente. Esto promueve fuerzas electrostáticas de repulsión que interfieren en la unión de la dcSTX con las partículas, como es en el caso de P7-Mer, cuya adsorción es significativamente inferior a la observada con las demás partículas de carbón activo. No obstante, existen otros factores que pueden afectar a la adsorción de las partículas, como la formación de enlaces de hidrógeno, interacciones dispersivas  $\pi$ - $\pi$  o interacciones hidrofóbicas. Además, la presencia de ciertos grupos funcionales, como el cloro o el nitrógeno, sobre la superficie de las partículas de carbón activo puede dificultar la adsorción (87).

El grafeno posee una gran superficie de adsorción, lo que podría convertirlo en un material adsorbente eficiente. El grado de retención del grafeno se basa principalmente en la combinación de dos mecanismos: por un lado, en los puntos de contacto que se generan entre los grupos funcionales del adsorbente y la superficie del grafeno y, por otro, en las interacciones dipolo inducido que forma con los compuestos catiónicos (88). La adsorción de dcSTX que observamos con las partículas de grafeno P3-Graf92 y P4-Graf99 es inferior a la observada con las partículas de carbón activado. En un modelo computacional se estudió la adsorción de las PSP en una lámina de grafeno (88) y se observó que los grupos guanidinio cargados positivamente interaccionaban con la superficie del grafeno mediante interacciones catión- $\pi$ . A pesar de ello, la dcSTX mostró una energía de adsorción más baja que el resto de las toxinas PSP analizadas. Además,

observaron que el grupo carbamato en STX y neoSTX presentó una mejor adsorción en comparación con el grupo hidroxilo de la dcSTX, lo que podría explicar la ineficiencia de las partículas P3-Graf92 y P4-Graf99 en la adsorción de la dcSTX. Por otro lado, el pH de carga superficial neutra para el óxido de grafeno es de 7 (89), por tanto, a un pH de 5,8, predominarían las cargas positivas en las partículas nanoestructuradas. Como se mencionó anteriormente, la dcSTX se convierte en especies mono y dicatiónicas a un pH por debajo de 7, favoreciendo la formación de interacciones electrostáticas repulsivas entre la dcSTX y la superficie de las partículas de grafeno, lo que también explica la baja adsorción observada en este estudio.

A pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas en la adsorción de dcSTX por P1-Pan en agua natural y en agua Milli-Q, el porcentaje de adsorción es ligeramente inferior en el agua natural. El pH del agua natural es de 7,23, lo que podría sugerir un aumento en la adsorción debido a la mayor presencia de grupos funcionales cargados negativamente en las partículas. Sin embargo, la presencia de materia orgánica en el agua natural podría saturar los puntos de unión de las partículas, impidiendo así la adsorción de la dcSTX. De hecho, un estudio comparativo sobre la adsorción de STX en agua natural y en agua tamponada observó que a un pH de 7, el efecto de la materia orgánica era más pronunciado (84). Por otro lado, podrían existir interacciones entre la dcSTX y la materia orgánica, dada la naturaleza catiónica de la toxina y la posible carga negativa de la materia orgánica (84).

La mayor parte de los estudios recogidos en la bibliografía se centran en la eliminación de STX en agua dulce, toxina representante de las PSP. Sin embargo, en ninguno de estos se propone la eliminación de la dcSTX. En España, la dcSTX, junto con otras toxinas del grupo de las PSP, fueron detectadas en cinco masas de agua dulce pertenecientes a las cuencas del Guadiana, del Tajo y del Guadalquivir. En particular, la dcSTX fue detectada en cuatro de estas cinco masas de agua (35). Dada su toxicidad y la falta de conocimiento sobre la exposición crónica a bajas concentraciones de estas toxinas, resulta crucial establecer una regulación para las PSP en agua dulce, equivalente a la que existe para el agua de mar. Por otro lado, la metodología que proponemos podría ser implementada en las plantas de tratamiento de agua, dado que los sistemas actuales no son suficientes para la eliminación de las PSP en agua dulce (36). Este método sería práctico y fácil de instalar en una planta potabilizadora debido a las propiedades magnéticas de las partículas

nanoestructuradas, lo que permitiría su fácil extracción del agua mediante un imán. Esta medida garantizaría una mayor seguridad en el agua destinada al consumo humano.

## 6. Conclusiones

---

- El método descrito es eficaz y funcional para la detoxificación de la dcSTX del agua dulce, empleando nanopartículas magnéticas.
- Se probaron ocho tipos de partículas y, en concreto, las P1-Pan que incorporaban carbón activado Panreac como material adsorbente resultaron ser las más eficaces.
- Las partículas P1-Pan eliminaron el 98% y el 93% de dcSTX en una disolución de agua Milli-Q y de agua natural, respectivamente, contaminada a una concentración tóxica.
- Las partículas P2-PanPec que contenían el mismo tipo de carbón activado que P1-Pan y pectina esterificada, demostraron una eficacia comparable a las P1-Pan, eliminando el 97% de dcSTX de una disolución de agua Milli-Q contaminada a una concentración toxica.

## 7. Bibliografía

---

1. Sarkar SK. *Marine algal bloom: Characteristics, causes and climate change impacts*: Springer; 2018.
2. Alvariño R. *Marine toxins*. In: Botana LM, editor. *Environmental Toxicology: Non-bacterial Toxins*. 2 ed. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH 2024. p. 171-96. <https://doi.org/10.1515/9783111014449>
3. Beasley V, Carmichael W, Haschek WM, Colegrove KM, Solter P. *Phycotoxins*. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Heinz-taheny KM, Rudmann DG, et al., editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. 3. 4 ed: Elsevier; 2023. p. 305-91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16153-7.00005-8>
4. Van Dolah FM. *General Considerations: Diversity of Marine and Freshwater Algal Toxins*. In: Botana LM, editor. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 1 ed: New York, Marcel Dekker; 2000. p. 19-43.
5. Rey López V. *Mejora e innovación en los procedimientos de detección y cuantificación de los métodos de análisis de toxinas PSP*. Lugo: Universidade de Santiago de Compostela; 2017 [cited on April 27, 2024]. Available on: <http://hdl.handle.net/10347/16346>
6. Botana LM. *Una visión de las toxinas marinas en el horizonte del año 2050 desde la perspectiva del cambio climático, bioseguridad y la seguridad alimentaria*. *bie3: Boletín IEEE*; 2018 June 14 [cited on June 10, 2024]. Report No.: 2530-125X Contract No.: 11. Available on: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6715649>
7. Turner AD, Lewis AM, Bradley K, Maskrey BH. *Marine invertebrate interactions with harmful algal blooms—implications for one health*. *Journal of invertebrate pathology*. 2021;186:107555. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107555>
8. Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, Mulder PP, Van den Top HJ, De Boer J. *Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation*. *Toxins*. 2010;2(4):878-904. <https://doi.org/10.3390/toxins2040878>
9. Otero P, Silva M. *Emerging marine biotoxins in European waters: potential risks and analytical challenges*. *Marine Drugs*. 2022;20(3):199. <https://doi.org/10.3390/md20030199>
10. Estevez P, Castro D, Pequeño-Valtierra A, Giraldez J, Gago-Martinez A. *Emerging marine biotoxins in seafood from European coasts: Incidence and analytical challenges*. *Foods*. 2019;8(5):149. <https://doi.org/10.3390/foods8050149>
11. Lehane L. *Paralytic shellfish poisoning: a potential public health problem*. *Medical journal of Australia*. 2001;175(1):29-31. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2001.tb143508.x>

12. Authority EFS. *Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins*. EFSA Journal. 2009;7(8):1306. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1306>
13. Pulido OM. *Domoic acid toxicologic pathology: a review*. Marine Drugs. 2008;6(2):180-219. <https://doi.org/10.3390/md6020180>
14. Twiner MJ, Hess P, Dechraoui M-YB, McMahon T, Samons MS, Satake M, et al. *Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines*. Toxicon. 2005;45(7):891-900. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.015>
15. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. Pharmacological reviews. 2005;57(4):397-409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.5>
16. Fukuda A, Tani A. *Records of puffer poisonings report 3*. Nippon Igaku Oyobi Kenko Hoken. 1941;3528:7-13.
17. Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. *Yessotoxin, a promising therapeutic tool*. Marine drugs. 2016;14(2):30. <https://doi.org/10.3390/md14020030>
18. Authority EFS. *Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain*. EFSA Journal. 2009;7(2):907. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.907>
19. Twiner M, Hess P, Doucette GJ. *Azaspiracids: toxicology, pharmacology, and risk assessment*. In: Botana López LM, editor. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 3 ed: CRC Press; 2014. p. 824-55.
20. James K, Fidalgo Saez M, Furey A, Lehane M. *Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption*. Food additives and contaminants. 2004;21(9):879-92. <https://doi.org/10.1080/02652030400002105>
21. Reguera B, Riobó P, Rodríguez F, Díaz PA, Pizarro G, Paz B, et al. *Dinophysis toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish*. Marine drugs. 2014;12(1):394-461. <https://doi.org/10.3390/md12010394>
22. Swift AE, Swift TR. *Ciguatera*. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology. 1993;31(1):1-29. <https://doi.org/10.3109/15563659309000371>
23. Bagnis R, Kuberski T, Laugier S. *Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific*. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1979;28(6):1067-73. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1979.28.1067>
24. Konoki K, Baden DG, Scheuer T, Catterall WA. *Molecular determinants of brevetoxin binding to voltage-gated sodium channels*. Toxins. 2019;11(9):513. <https://doi.org/10.3390/toxins11090513>
25. Watkins SM, Reich A, Fleming LE, Hammond R. *Neurotoxic shellfish poisoning*. Marine drugs. 2008;6(3):431-55. <https://doi.org/10.3390/md6030431>

26. Otero A, Chapela M-J, Atanassova M, Vieites JM, Cabado AG. *Cyclic imines: chemistry and mechanism of action: a review*. *Chemical Research in Toxicology*. 2011;24(11):1817-29. <https://doi.org/10.1021/tx200182m>
27. Meilert K, Brimble MA. *Synthesis of the bis-spiroacetal moiety of the shellfish toxins spirolides B and D using an iterative oxidative radical cyclization strategy*. *Organic & biomolecular chemistry*. 2006;4(11):2184-92. <https://doi.org/10.1039/b604334h>
28. Authority EFS. *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish—Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins)*. *EFSA Journal*. 2010;8(6):1628. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1628>
29. Chain EPoCitF, Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, et al. *Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods*. *EFSA Journal*. 2017;15(4):4752. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4752>
30. Commission E. *Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls*. *Official Journal of the European Union*. 2019 [cited on May 2, 2024];L31:51-100. Available on: [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2019/627/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/627/oj)
31. Authority EFS. *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group*. *EFSA Journal*. 2010;8(7):1677. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1677>
32. Sivonen K. *Freshwater toxins: freshwater cyanobacterial neurotoxins: ecobiology, chemistry, and detection*. In: Botana LM, editor. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 1 ed: New York, Marcel Dekker; 2000. p. 567-82.
33. Negri AP, Jones GJ. *Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium Anabaena circinalis by the freshwater mussel Alathyria condola*. *Toxicon*. 1995;33(5):667-78. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00180-G](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00180-G)
34. Christoffersen K. *Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs*. *Phycologia*. 1996;35(sup6):42-50. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-42.1>
35. Wörmer L, Cirés S, Agha R, Verdugo M, de Hoyos C, Quesada A. *First detection of cyanobacterial PSP (paralytic shellfish poisoning) toxins in Spanish freshwaters*. *Toxicon*. 2011;57(6):918-21. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.022>
36. Cao A, Vilariño N, de Castro-Alves L, Piñeiro Y, Rivas J, Botana AM, et al. *Nanostructured Magnetic Particles for Removing Cyanotoxins: Assessing Effectiveness and Toxicity In Vitro*. *Toxins*. 2024;16(6):269. <https://doi.org/10.3390/toxins16060269>

37. Fosso-Kankeu E, Mishra AK. *Photocatalytic degradation and adsorption techniques involving nanomaterials for biotoxins removal from drinking water*. In: Grumezescu Mihai A, editor. *Water Purification*: Academic Press; 2017. p. 323-54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804300-4.00009-5>
38. Lee J, Lee S, Jiang X. *Cyanobacterial toxins in freshwater and food: important sources of exposure to humans*. *Annual review of food science and technology*. 2017;8:281-304. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030116>
39. Pantelić D, Svirčev Z, Simeunović J, Vidović M, Trajković I. *Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia*. *Chemosphere*. 2013;91(4):421-41. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.003>
40. Svirčev Z, Lalić D, Bojadžija Savić G, Tokodi N, Drobac Backović D, Chen L, et al. *Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings*. *Archives of toxicology*. 2019;93(9):2429-81. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
41. González-Jartín JM, de Castro Alves L, Alfonso A, Piñeiro Y, Vilar SY, Rodríguez I, et al. *Magnetic nanostructures for marine and freshwater toxins removal*. *Chemosphere*. 2020;256:127019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127019>
42. Theron J, Walker JA, Cloete TE. *Nanotechnology and water treatment: applications and emerging opportunities*. *Critical reviews in microbiology*. 2008;34(1):43-69. <https://doi.org/10.1080/10408410701710442>
43. Shak KPY, Pang YL, Mah SK. *Nanocellulose: Recent advances and its prospects in environmental remediation*. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2018;9(1):2479-98. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.232>
44. Xu X, Liu F, Jiang L, Zhu J, Haagensohn D, Wiesenborn DP. *Cellulose nanocrystals vs. cellulose nanofibrils: a comparative study on their microstructures and effects as polymer reinforcing agents*. *ACS applied materials & interfaces*. 2013;5(8):2999-3009. <https://doi.org/10.1021/am302624t>
45. Dimitrov K, Herzog M, Nenkova S. *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modification of microcrystalline cellulose for composite materials*. *American Journal of Chemistry*. 2013;3(5):140-7. <https://doi.org/10.5923/j.chemistry.20130305.04>
46. Watanabe R, Suzuki T, Oshima Y. *Preparation of calibration standards of NI-H paralytic shellfish toxin analogues by large-scale culture of cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04)*. *Marine drugs*. 2011;9(3):466-77. <https://doi.org/10.3390/md9030466>
47. Wang S, Tang D, He F, Fukuyo Y, Azanza RV. *Occurrences of harmful algal blooms (HABs) associated with ocean environments in the South China Sea*. *Hydrobiologia*. 2008;596:79-93. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9059-4>

48. Shumway SE. *A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture*. Journal of the world aquaculture society. 1990;21(2):65-104. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1990.tb00529.x>
49. Schantz EJ, Mold JD, Stanger DW, Shavel J, Riel FJ, Bowden JP, et al. *Paralytic Shellfish Poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissues*. Journal of the American Chemical Society. 1957;79(19):5230-5. <https://doi.org/10.1021/ja01576a044>
50. Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA. *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs*. Marine drugs. 2010;8(7):2185-211. <https://doi.org/10.3390/md8072185>
51. Etheridge SM. *Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives*. Toxicon. 2010;56(2):108-22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.013>
52. Negri A, Stirling D, Quilliam M, Blackburn S, Bolch C, Burton I, et al. *Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate Gymnodinium catenatum*. Chemical Research in Toxicology. 2003;16(8):1029-33. <https://doi.org/10.1021/tx034037j>
53. Rey V, Botana AM, Otero P, Botana LM. *Improved chemical hydrolysis conditions for the high conversion of the paralytic shellfish toxins GC4 and GC5 into their decarbamoyl analogues dcGTX1 and dcGTX4*. Food Chemistry Advances. 2023;2:100289. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100289>
54. Gessner BD, McLaughlin JB. *Epidemiologic impact of toxic episodes: neurotoxic toxins*. In: Botana LM, editor. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 2 ed: CRC Press; 2008. p. 77-103.
55. Halstead BW. *Poisonous and venomous marine animals of the world: invertebrates*. Washington, D.C.: US Government Printing Office; 1965.
56. Lagos N, Andrinolo D. *Paralytic shellfish poisoning (PSP): Toxicology and kinetics*. In: Botana López LM, editor. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 1 ed: New York, Marcel Dekker; 2000. p. 203-15.
57. Suarez-Isla BA. *Saxitoxin and other paralytic toxins: Toxicological profile*. In: Gopalakrishnakone P, Haddad J, Tubaro A, Kim E, Kem William R, editors. *Marine and Freshwater Toxins*: Springer; 2015. p. 23-41. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6650-1\\_25-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6650-1_25-1)
58. Authority EFS. *Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group*. EFSA Journal. 2009;7(4):1019. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1019>
59. Vale C, Alfonso A, Vieytes MR, Romarís XM, Arevalo F, Botana AM, et al. *In vitro and in vivo evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin potency and the influence of the pH of extraction*. Analytical Chemistry. 2008;80(5):1770-6. <https://doi.org/10.1021/ac7022266>

60. Sommer H, Meyer K. *Paralytic Shell-Fish Poisoning*. Arch Pathol. 1937;24(5):560-98.
61. FAO, WHO. *Toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs* 2016.
62. Munday R, Thomas K, Gibbs R, Murphy C, Quilliam MA. *Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration*. Toxicon. 2013;76:77-83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.013>
63. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, et al. *Nomenclature of voltage-gated sodium channels*. Neuron. 2000;28(2):365-8. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00116-1)
64. Perez S, Vale C, Botana AM, Alonso E, Vieytes MR, Botana LM. *Determination of toxicity equivalent factors for paralytic shellfish toxins by electrophysiological measurements in cultured neurons*. Chemical research in toxicology. 2011;24(7):1153-7. <https://doi.org/10.1021/tx200173d>
65. Alonso E, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. *Evaluation of toxicity equivalent factors of paralytic shellfish poisoning toxins in seven human sodium channels types by an automated high throughput electrophysiology system*. Archives of toxicology. 2016;90:479-88. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1444-y>
66. AOAC. *Official method 959.08. Paralytic shellfish poison: biological method. First action, 1959. Final action, Sec. 49.10.01*. In: Horwitz W, editor. Official methods of analysis. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International; 2005.
67. Bates HA, Kostriken R, Rapoport H. *A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications*. Journal of agricultural and food chemistry. 1978;26(1):252-4. <https://doi.org/10.1021/jf60215a060>
68. Luckas B. *Paralytic Shellfish Poisoning (PSP): Chemical analysis of PSP toxins*. In: Botana LM, editor. Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. 1 ed: New York, Marcel Dekker; 2000. p. 173-86.
69. Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Collaborators:. *Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Collaborative Study*. AOAC INTERNATIONAL. 2019;88(6):1714-32. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.6.1714>
70. AOAC. *Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish, prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection, first action 2005, method 2005.06*. In: International A, editor. Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 88. Gaithersburg, MD 2006. p. 1714.
71. Turner AD, Norton DM, Hatfield RG, Morris S, Reese AR, Algoet M, et al. *Refinement and extension of AOAC Method 2005.06 to include additional toxins in*

*mussels: single-laboratory validation*. AOAC International. 2009;92(1):190-207. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.190>

72. Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco ML, Gago-Martínez A. *Extension of the validation of AOAC official method SM 2005.06 for dc-GTX2, 3: Interlaboratory study*. AOAC International. 2012;95(1):111-21. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-446>

73. CRLMB. *Report on the study on the determination of PSP toxins in shellfish including GTX6 after hydrolysis (AOAC official method 2005.06)*. Vigo, España: AESAN; 2007.

74. Rey V, Botana AM, Botana LM. *Quantification of PSP toxins in toxic shellfish matrices using post-column oxidation liquid chromatography and pre-column oxidation liquid chromatography methods suggests post-column oxidation liquid chromatography as a good monitoring method of choice*. Toxicon. 2017;129:28-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.003>

75. Oshima Y. *Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins*. Journal of AOAC International. 1995;78(2):528-32. <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.2.528>

76. Van de Riet J, Gibbs RS, Muggah PM, Rourke WA, MacNeil JD, Quilliam MA. *Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: collaborative study*. AOAC International. 2011;94(4):1154-76. <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.4.1154>

77. Botana A, López VR. *Chemistry and analysis of PSP toxins*. Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry. 2015:69-84. <https://doi.org/10.1002/9781118500354.ch4>

78. Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam MA. *Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins*. Journal of chromatography A. 2005;1081(2):190-201. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.056>

79. Besbes N, Monser L, Nabli BA, Sadok S. *Determination of hydrophilic marine biotoxins in bivalve molluscs by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. Journal of Food Composition and Analysis. 2024;130:106169. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106169>

80. Thibault P, Pleasance S, Laycock M. *Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A. 1991;542:483-501. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88783-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88783-5).

81. Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco M, Otero A, Vieites J, Cabado A. *A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish*. Toxicon. 2012;60(5):864-73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.022>

82. Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. *Toxins of cyanobacteria*. Molecular nutrition & food research. 2007;51(1):7-60. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>
83. Pelekani C, Snoeyink V. *Competitive adsorption in natural water: role of activated carbon pore size*. Water research. 1999;33(5):1209-19. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00329-7)
84. Shi H, Ding J, Timmons T, Adams C. *pH effects on the adsorption of saxitoxin by powdered activated carbon*. Harmful Algae. 2012;19:61-7. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.05.008>
85. Rogers RS, Rapoport H. *The pKa's of saxitoxin*. Journal of the American chemical society. 1980;102(24):7335-9. <https://doi.org/10.1021/ja00544a030>
86. Huang W-J, Cheng B-L, Cheng Y-L. *Adsorption of microcystin-LR by three types of activated carbon*. Journal of Hazardous Materials. 2007;141(1):115-22. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.122>
87. Mansour F, Al-Hindi M, Yahfoufi R, Ayoub GM, Ahmad MN. *The use of activated carbon for the removal of pharmaceuticals from aqueous solutions: a review*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2018;17(1):109-45. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9456-8>
88. Rey López V, Botana López AM, Álvarez M, Antelo Queijo Á, Botana López LM. *Computational model of adsorption for paralytic shellfish poisoning toxins (PSTs) on graphene surface*. Proceedings of the 20th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry; Nov 1-30; Basel, Switzerland: MDPI; 2016. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-20-e006>
89. Pavagadhi S, Tang ALL, Sathishkumar M, Loh KP, Balasubramanian R. *Removal of microcystin-LR and microcystin-RR by graphene oxide: adsorption and kinetic experiments*. Water research. 2013;47(13):4621-9. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.033>