

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE**  
**BIOLOGIA EN ACUICULTURA**



**FLORACIONES ALGALES NOCIVAS (FAN)**  
**MARINAS Y SUS EFECTOS EN LA SALUD**  
**HUMANA Y LA MARICULTURA**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR EL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGO ACUICULTOR**

**AUTOR : Bach. DANIEL SILVA ELÍAS**

**ASESOR : MSc. RÓMULO LOAYZA AGUILAR**

**Nuevo Chimbote - Perú**  
**2008**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
BIOLOGIA EN ACUICULTURA

**CARTA DE CONFORMIDAD DEL ASESOR**

La presente monografía ha sido revisada y desarrollada en cumplimiento del objetivo propuesto y reúne las condiciones formales y metodológicas, estando encuadrado dentro de las áreas y líneas de Investigación conforme al Reglamento General para obtener el Título Profesional en la Universidad Nacional del Santa (Resolución N° 471-2002-CU-R-UNS), de acuerdo a la denominación siguiente:

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO ACUICULTOR**

**TITULO : FLORACIONES ALGALES NOCIVAS (FAN) MARINAS Y SUS  
EFECTOS EN LA SALUD HUMANA Y LA MARICULTURA**

**AUTOR : DANIEL SILVA ELÍAS  
BACHILLER EN CIENCIAS DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**

-----  
**MSc. RÓMULO LOAYZA AGUILAR**  
ASESOR

**Nuevo Chimbote, Febrero del 2008**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
BIOLOGÍA EN ACUICULTURA

**CARTA DE CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR DE TESIS**

Damos conformidad del presente estudio, desarrollado en cumplimiento del objetivo propuesto y presentado conforme al Reglamento General para obtener el Grado Académico de Bachiller y el Título Profesional en la Universidad Nacional del Santa (Resolución N° 471-2002-CU-R-UNS ), titulado:

**FLORACIONES ALGALES NOCIVAS (FAN) MARINAS Y  
SUS EFECTOS EN LA SALUD HUMANA Y LA MARICULTURA**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO ACUICULTOR**

Presentado por: **DANIEL SILVA ELÍAS**  
**BACHILLER EN CIENCIAS DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA**

Revisada y Evaluada por el siguiente Jurado Evaluador

  
-----  
**MSc. Juan Fernando Merino Moya**  
**Presidente**

  
-----  
**MSc. Lucio Encomendero Yépez**  
**Integrante**

  
-----  
**MSc. Rómulo Loayza Aguilar**  
**Integrante**

**Nuevo Chimbote, Febrero del 2008**

## DEDICATORIA

*A Dios por darme la vida, por darme una hermosa familia, por las oportunidades, cualidades y talentos, que tengo para la realización de mis sueños aquí en la tierra.*

*A mis Padres Víctor Silva y Socorro Elías, por darme todas las oportunidades de poder salir adelante en cada una de las metas trazadas y sobre todo por el apoyo incondicional durante todo el transcurso de mi vida, mil gracias por ello.*

*A mis hermanos Víctor A. Silva; Wilmer Silva y Jaime N. Silva, por su gran apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.*

## PRESENTACIÓN

*La presente monografía denominada **Floraciones algales nocivas (FAN) marinas y sus efectos en la salud humana y la maricultura;** describe los principales aspectos que se encuentran registrados en la literatura mundial, enfatizando en la determinación de biotoxinas, que son causa de daños significativos en los ecosistemas marinos, a los cultivos que se practican en estos sistemas y también en el hombre.*

*Se pretende con esta monografía despertar el interés para iniciar los estudios sobre las floraciones algales nocivas en el Perú, y de modo particular en el litoral de Ancash, espacio propicio al desarrollo de las FAN.*

## CONTENIDOS

	pág.
DEDICATORIA	i
PRESENTACIÓN	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ESPECIES TÓXICAS Y POTENCIALES	6
2.1. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE CONTACTO DÉRMICO	10
2.2. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE INHALACIÓN	10
2.3. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA INGESTIÓN DE AGUA O ESPUMA	11
2.4. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA INGESTA DE ALIMENTOS	12
III. MAREAS ROJAS	13
IV. CLASIFICACIÓN DE LAS BIOTOXINAS MARINAS	29
4.1. TOXINA AMNÉSICA DE MOLUSCO (ASP, "AMNESIC SHELLFISH POISONING")	30
a. Estructura química y propiedades	31
b. Organismos y condiciones favorables	34
c. Distribución	35
d. Impactos causados en la maricultura	36
e. Toxicidad de las toxinas ASP	37

4.2.	TOXINA DIARREICA DE MOLUSCO (DSP, "DIARRHETIC SHELLFISH POISONING")	38
a.	Estructura química y propiedades	39
b.	Organismos y condiciones favorables	44
c.	Distribución	45
d.	Impactos causados en la maricultura	46
e.	Toxicidad de las toxinas DSP	48
4.3.	TOXINA PARALIZANTE DE MOLUSCO (PSP, "PARALITIC SHELLFISH POISONING")	49
a.	Estructura química y propiedades	50
b.	Organismos y condiciones favorables	52
c.	Distribución	55
d.	Impactos causados en la maricultura	55
e.	Toxicidad de las toxinas PSP	57
4.4.	TOXINA NEUROTÓXICA DE MOLUSCO (NSP, "NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING")	61
a.	Estructura química y propiedades	62
b.	Organismos y condiciones favorables	66
c.	Distribución	67
d.	Impactos causados en la maricultura	67
e.	Toxicidad de las toxinas NSP	68
V.	ENSAYOS PARA DETERMINAR FICOTOXINAS MARINAS	70
5.1.	TOXINAS PARALIZANTE (PSP) Y DIARREICAS (DSP) DETERMINADAS POR BIOENSAYOS	75
a.	Detección de Veneno Paralizante de los Mariscos (PSP)	75
b.	Detección de Veneno Diarreico de los Mariscos (DSP)	76

5.2.	TOXINAS PARALIZANTE (PSP) Y DIARREICAS (DSP) DETERMINADAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)	78
5.3.	RADIOENSAYOS PARA DETERMINAR TOXINAS PARALIZANTES (PSP)	80
5.4.	ENSAYOS COLORIMÉTRICOS PARA DETERMINAR TOXINAS DIARREICAS (DSP)	82
5.5.	TOXINA AMNÉSICA DE MOLUSCO (ASP, "AMNESIC SHELLFISH POISONING")	83
	a. Enlace con receptores	83
	b. Ensayos químicos	83
	Cromatografía de capa fina	83
	Cromatografía Líquida (CL)	84
	Electroforesis Capilar (EC)	85
	Espectrometría de Masa	85
VI.	DISCUSIÓN	87
VII.	CONCLUSIONES	90
VIII.	RECOMENDACIONES	91
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXO	100

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Fig. 1. Conceptos históricos sobre el desarrollo de mareas rojas. A) nutrientes = marea roja. B) nutrientes (soporte y mantenimiento) + corrientes (concentración) = marea roja.	15
Fig. 2. Concepto actual de marea roja por dinoflagelados según Steidinger, involucra cuatro fases de desarrollo (círculo central). Factores fisicoquímicos (círculo medio) y transporte cíclico: bentos-plancton-bentos (círculo externo).	16
Fig. 3. Rango de concentraciones celulares de microalgas planctónicas tóxicas dentro de las cuales se manifiesta la presencia de toxinas en los bivalvos.	18
Fig. 4. Distribución de las diferentes FAN a nivel mundial en las últimas décadas.	20
Fig. 5. Pasos que se debe de seguir para identificar de forma inequívoca las posibles toxinas marinas.	22
Fig. 6. Estructura química del ácido domóico y sus isómeros.	33
Fig. 7. Estructura química del ácido okadaico, y el de las dinofisistoxinas.	41
Fig. 8. Estructura química de las pectenotoxinas.	42
Fig. 9. Estructura química de las yesotoxinas y de la adriatoxina.	43
Fig. 10. Estructuras químicas de las toxinas PSP.	51
Fig. 11. Esquema simplificado del ciclo de vida de un dinoflagelado con su quiste de resistencia.	53
Fig. 12. Esquema que muestra los canales iónicos involucrados en la generación de un potencial de acción y la correspondiente repolarización en un axón.	58

Fig. 13.	Diagrama de las funcionales del canal de Sodio voltaje dependiente (A) y de los hipotéticos sitios de unión a toxinas y fármacos (B): tetrodotoxinas (TTX); toxinas de anémonas (ScTx); batratoxinas, aconitina, veratridina y grayanotoxina (BTX); anestésicos locales (LA).	59
Fig. 14.	Esquema de un canal de sodio, con sus cuatro dominios (D), cada dominio contiene 6 hélices que atraviesan la membrana celular.	60
Fig. 15.	Estructuras químicas de las brevetoxinas de tipo A y B.	63
Fig. 16.	Estructuras químicas de los análogos de las brevetoxinas A) BTX-B1, BTX-B2 y BTX-B4 aisladas de mariscos contaminados; B) BTX-B3.	64
Fig. 17.	Toxina ictiotóxica fosforada aislada del <i>G. breve</i> .	65
Fig. 18.	Etapas a seguir para la determinación de biotoxinas del grupo PSP en moluscos con el método del bioensayo en el ratón.	76
Fig. 19.	Etapas a seguir para la determinación de biotoxinas del grupo DSP en moluscos con el método del bioensayo en el ratón.	77
Fig. 20.	Equipo de cromatografía marca Sephadex LH-20.	80
Fig. 21.	Equipo de difractorómetro ENRAFNONIU.	81
Fig. 22.	Espectrómetro VG-Autospec FISIONS, para determinación de toxinas por espectro de masa.	86

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Especies de microalgas que tienden a formar las FAN y que son catalogadas como dañinas a nivel mundial.	7
Tabla 2. Algunas posibles rutas de exposición a toxinas cianobacterianas o marinas vía aguas continentales (C), aguas de transición (E) o marinas (M).	9
Tabla 3. Estudios de los efectos de la eutrofización en la formación y aumento de las mareas rojas en todo el mundo.	23
Tabla 4. Principales especies microalgales asociadas con la aparición de eventos tóxicos en el Cono Sur Americano.	25
Tabla 5. Síndromes de intoxicaciones causadas por toxinas marinas en Chile.	27
Tabla 6. Valores máximos de concentración de toxinas según el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo N° 853/ 2004.	28
Tabla 7. Valores máximos de concentración de biotoxinas según Resolución Ministerial N° 730 – 2003 – SA/DM.	29
Tabla 8. Impactos de las toxinas ASP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la maricultura.	36
Tabla 9. Impactos de las toxinas DSP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la maricultura y salud humana.	47
Tabla 10. Impactos de las toxinas PSP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la maricultura y salud humana.	56
Tabla 11. Impactos de las toxinas NSP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la acuicultura.	68
Tabla 12. Métodos analíticos de determinación de toxinas.	71

de un cierto tiempo más o menos largo, el fenómeno se disipa, a menudo rápidamente, al cambiar las condiciones hidrológicas que lo produjeron o porque ya no se producen aportes de nutrientes.

La Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO, en junio de 1992 adoptó en un sentido más amplio el término de “Floraciones Algales Nocivas” FAN (en inglés “Harmful Algal Blooms” o su acrónimo HAB), para designar las proliferaciones de un heterogéneo grupo de microorganismos que son percibidos como dañinos para el hombre por sus efectos adversos en la salud humana, en las explotaciones de acuicultura, turismo y en las poblaciones naturales de organismos marinos. La palabra FAN, no es un término científico, sino un término operativo que es ampliamente aceptado por la comunidad de científicos y por los gestores sanitarios y medioambientales (Álvarez & Herrera, ??; Hallegraeff & Hara, 1995).

Si bien este término de FAN, se inspiró en las manchas de dinoflagelados planctónicas, hoy en día se usa para cualquier población microalgal; incluyendo también a las FAN, cuyas concentraciones celulares no sean muy elevadas, pero que su aparición conlleve un efecto nocivo sin producir necesariamente toxicidad o tienda a causar algunas alteraciones en la cadena trófica como son la hipoxia y anoxia o daños mecánicos en la obstrucción de las branquias de los animales y la necrosis de las mismas (Anónimo, 2001; Hernández, 1996).

Entre los organismos causales de las FAN se incluyen los dinoflagelados, otros flagelados, cianobacterias, diatomeas y otros grupos del fitoplancton de menor importancia. No todos los eventos causados por las algas nocivas conllevan el desarrollo de importantes acumulaciones de biomasa. Muchas especies de dinoflagelados son nocivas aun en bajas concentraciones. Así

mismo se debe señalar que algunas FAN son causadas por la proliferación de microalgas que presentan una etapa bentónica, llegando a producir toxinas que pueden ser transferidas a otros organismos mediante la cadena alimentaria (Hernández, 1996). Suárez & Guzmán (??), presentaron un censo en el que de las 3000 a 4000 especies reconocidas del fitoplancton marino, sólo alrededor de 200 especies han producido florecimientos masivos y la capacidad de producir toxinas potentes, es aún más reducida ya que sólo se han reconocido alrededor de unas 80 especies tóxicas, aunque este número se está incrementando rápidamente cada año.

El incremento constante de los afluentes industriales, las aguas municipales y la mejora en las técnicas de los cultivo en la acuicultura ha traído perturbaciones en los ambientes marinos, que se ve reflejado en el incremento de las proliferaciones de diferentes tipos de organismos entre ellas las FAN, que tienden a ocasionar grandes pérdidas en los cultivos marinos en diferentes zonas del mundo (Buschmann, 2005; Hernández, 1996).

La acuicultura es una actividad económica muy rentable que genera empleo y alimentos prioritariamente. Se ha desarrollado mucho en las últimas décadas, por lo que también se le menciona como la “revolución azul” en países como Japón, China, Tailandia, Oceanía entre otros. En estos países constituye una actividad prioritaria y su importancia radica en que es una gran fuente de divisas (Chamberlain, 1999).

El crecimiento de la acuicultura con relación a otros sectores de producción de alimento de origen animal continúa creciendo con la contribución del suministro mundial de peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos. Aumentó del 3,9 por ciento de la producción total en peso en 1970, al 27,1 por

ciento en 2000 y al 32,4 por ciento en 2004. En todo el mundo, la tasa media de crecimiento de este sector ha sido del 8,8 por ciento al año desde 1970, mientras que, durante el mismo período, la pesca de captura ha crecido solamente a razón del 1,2 por ciento y los sistemas de producción de carne de cría en tierra, un 2,8 por ciento (FAO, 2006).

El incremento de la maricultura para el año 2004 aportó el 36,0 por ciento de la producción en cantidad y el 33,6 por ciento del valor total. Si bien gran parte de la producción marina consiste en peces de valor elevado, incluye también una gran cantidad de mejillones y ostras (FAO, 2006); siendo las microalgas tóxicas las causantes de grandes mortandades en los peces en cultivo y en la mayoría de casos constituyen parte de la alimentación de los moluscos bivalvos que se nutren por filtración. Las toxinas se acumulan en la fracción comestible de los moluscos, con el problema adicional de que pueden persistir a lo largo del proceso de depuración de los moluscos (Fernández *et al.*, 2002).

Las toxinas generadas por las microalgas (ficotoxinas) son compuestos químicos que en comparación con otras toxinas naturales son de bajo peso molecular, de naturaleza no proteica muy estables al calor; debido a esto los procesos de cocción, ahumado, secado y salado no las destruyen (Suárez, 2004).

Las ficotoxinas comprenden un amplio espectro de sustancias de estructura molecular, mecanismos de acción y actividad biológica muy diversa. Los síndromes asociados en humanos por éstas toxinas son: la intoxicación paralizante por moluscos (PSP), intoxicación diarreica por moluscos (DSP), intoxicación neurotóxica por moluscos (NSP) e intoxicación amnésica por moluscos (ASP) (FAO, 2005; Fernández & Diógenes, ??; Hernández, 1996).

Debido a la gran cantidad de toxinas que se presentan a nivel mundial que causan daños al hombre, en los países europeos se ha dispuesto una serie de reglamentaciones, para poder controlar los límites permisibles de las biotoxinas en los productos de origen marino, siendo más detallado el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo (CE) N° 853/2004, quién establece las normas específicas de higiene en los productos alimenticios de origen animal, asegurando la inocuidad del producto, llegando a garantizar un elevado nivel de protección a los consumidores. En el Perú la Resolución Ministerial N° 730 – 2003/SA/DM establece los límites permisibles de biotoxinas en los moluscos a exportar, siendo similares a los establecidos por el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el presente trabajo tiene por objetivo la explicación de la formación, crecimiento y dinámica de las floraciones algales nocivas marinas así como los efectos adversos que causan en la maricultura y la salud humana, con el fin de poder implementar en un futuro estudios y monitoreos de cómo la eutrofización de los cuerpos marinos inciden en la proliferación de las FAN, en todo el litoral peruano, poniendo un énfasis primordial en las zonas de recolección de moluscos y las zonas donde se encuentran las concesiones de empresas que producen productos marinos con fines de exportación, logrando para ello contar con el apoyo de las instituciones publicas y privadas.

## II. ESPECIES TÓXICAS Y POTENCIALES

Si bien a lo largo de toda la historia se han registrado brotes de algas tóxicas y no tóxicas en el mar, estos se han incrementado durante las últimas décadas (Anderson *et al.*, 2002; Smayda, 2002). En diversas áreas, tales como el Mar Báltico, Mar del Norte, Mar Adriático, costas del Japón y Golfo de México, estos florecimientos se han convertido en un fenómeno constante y su elevada frecuencia se debe a que existía un enriquecimiento nutricional de las aguas costeras a escala global (Smayda, 2002). Esta expansión progresiva de las ocurrencias está asociada al creciente impacto antropogénico sobre las áreas costeras que a su vez pueden ser responsables de los cambios en la disponibilidad de nutrientes dentro de las aguas costeras, y así fomentar el crecimiento de algas tóxicas (Anónimo, 2002; Buschmann, 2005).

Hernández (1996) y Chávez *et al.* (2005), mencionan que las especies productoras de toxinas y aquellas asociadas con las FAN a nivel mundial (tabla 1), son las que pertenecen a las clases: Dinophyceae, Dictyochophyceae, Raphidophyceae y Bacilliarophyceae.

Varios dinoflagelados y flagelados marinos, han sido asociados con la muerte de peces y/o invertebrados. Algunos de los más comunes son los dinoflagelados *Gyrodinium aureolum*, *Gyrodinium galatheanum* y *Pfiesteria piscicida*, los flagelados Raphidoceae (*Heterosigma akashiwo*, *Chattonella antiqua*, *Chattonella marina*) y los Prymnesiophyceae (*Prymnesium parvum*, *Chrysochromulina polylepis*) y otras especies de *Chrysochromulina* (Moestrup, 1994).

Tabla 1. Especies de microalgas que tienden a formar las FAN y que son catalogadas como dañinas a nivel mundial.

HAPTOFITAS DIVISIÓN: HAPTOPHYTA	RAPHIDOPHYCEAS DIVISIÓN: HETEROKONTAE	DIATOMEAS DIVISIÓN: HETEROKONTAE
Clase: Prymnesiophyceae, Haptophyceae	Clase: Raphidophyceae	Clase: Bacillariophyceae
<i>Chrysochromulina leadbeateri</i> <i>Chrysochromulina polylepis</i> <i>Phaeocystis globosa</i> <i>Phaeocystis pouchetii</i> <i>Prymnesium calathiferum</i> <i>Prymnesium faveolatum</i> <i>Prymnesium parvum</i> <i>Prymnesium patelliferum</i> <i>Prymnesium zebrinum</i>	<i>Chattonella antiqua</i> <i>Chattonella globosa</i> <i>Chattonella marina</i> <i>Chattonella subsalsa</i> <i>Chattonella verruculosa</i> <i>Fibrocapsa japonica</i> <i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Amphora coffeaeformis</i> <i>Nitzschia navis-varingica</i> <i>Pseudo-nitzschia australis</i> <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> <i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i> <i>Pseudo-nitzschia galaxiae</i> <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> <i>Pseudo-nitzschia turgidula</i>
<b>DINOFLAGELADO</b> <b>DIVISIÓN: DINOPHYTA</b>		
<b>CLASE: DINOPHYCEAE</b>		
Orden: Gymnodiniales	Orden: Dinophysiales	Orden: Gonyaulacales
<i>Amphidinium carterae</i> <i>Amphidinium operculatum</i> <i>Amphidinium operculatum</i> var. <i>gibbosum</i> <i>Cochlodinium polykrikoides</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Gyrodinium corsicum</i> <i>Karenia bicuneiformis</i> <i>Karenia brevis</i> <i>Karenia brevisulcata</i> <i>Karenia concordia</i> <i>Karenia cristata</i> <i>Karenia mikimotoi</i> <i>Karenia papilionacea</i> <i>Karenia selliformis</i> <i>Karenia umbella</i>	<i>Dinophysis acuminata</i> <i>Dinophysis acuta</i> <i>Dinophysis caudata</i> <i>Dinophysis fortii</i> <i>Dinophysis miles</i> <i>Dinophysis mitra</i> <i>Dinophysis norvegica</i> <i>Dinophysis rapa</i> <i>Dinophysis rotundata</i> <i>Dinophysis sacculus</i> <i>Dinophysis tripos</i>	<i>Alexandrium acatenella</i> <i>Alexandrium andersonii</i> <i>Alexandrium balechii</i> <i>Alexandrium catenella</i> <i>Alexandrium fundyense</i> <i>Alexandrium minutum</i> <i>Alexandrium monilatum</i> <i>Alexandrium ostenfeldii</i> <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> <i>Coolia monotis</i> <i>Gambierdiscus pacificus</i> <i>Gambierdiscus polynesiensis</i> <i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Gambierdiscus yasumotoi</i> <i>Ostreopsis lenticularis</i> <i>Ostreopsis mascarenensis</i>

<i>Karlodinium micrum</i>		<i>Ostreopsis siamensis</i>
<i>Karlodinium veneficum</i>		<i>Protoceratium reticulatum</i>
<i>Takayama cladochroma</i>		<i>Pyrodinium bahamense</i>
Orden: Prorocentrales	Orden: Prorocentrales	Orden: Peridinales
<i>Prorocentrum arabianum</i>	<i>Prorocentrum emarginatum</i>	<i>Heterocapsa circularisquama</i>
<i>Prorocentrum arenarium</i>	<i>Prorocentrum faustiae</i>	<i>Pfiesteria piscicida</i>
<i>Prorocentrum belizeanum</i>	<i>Prorocentrum hoffmannianum</i>	<i>Pfiesteria shumwayae</i>
<i>Prorocentrum borbonicum</i>	<i>Prorocentrum lima</i>	<i>Protoperidinium crassipes</i>
<i>Prorocentrum cassubicum</i>	<i>Prorocentrum maculosum</i>	
<i>Prorocentrum concavum</i>	<i>Prorocentrum minimum</i>	
	<i>Prorocentrum rhathymum</i>	

Adaptado de Chávez *et al.* (2005).

Las microalgas productoras de estas potentes toxinas endonucleares con propiedades hemolíticas o neurotóxicas causan daños considerables a los seres humanos y la acuicultura. Las toxinas tienen fuertes efectos citotóxicos para la mayoría de especies tales como *Chrysochromulina polylepis* y *Prymnesium parvum* (Reguera, 2002). Las microalgas *Gyrodinium aureolum* y *Gyrodinium galatheanum* pueden producir degeneración necrótica severa de las branquias y producir toxinas con efectos hemolíticos. Además, *Pfiesteria piscicida* produce una neurotoxina no identificada (Nielsen, 1993). Se ha encontrado que las toxinas de algunas especies de microalgas se acumulan en los mariscos tales como mejillones, vieiras y ostras. Asimismo, es posible que ocurra una acumulación de toxinas en otros organismos marinos durante exposiciones a niveles sub letales de toxinas (Stabell *et al.*, 1993).

En el presente trabajo no se tocará a fondo las FAN causadas por las cianobacterias en las aguas continentales ya que no constituyen el objeto de estudio; sin embargo también causan gran mortandad debido principalmente a las sustancias hepatotóxicas y neurotóxicas que tienden a desarrollar en

densas floraciones en los embalses de agua, siendo el caso más conocido el ocurrido en Caruaru (Brasil), donde numerosos pacientes renales sometidos a diálisis murieron (Reguera, 2002; Roset *et al.*, 2001).

Reguera (2003) y Roset *et al.* (2001), hacen mención que las intoxicaciones en los humanos por FAN, presentan determinadas rutas de exposición siendo las más comunes las que se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Algunas posibles rutas de exposición a toxinas cianobacterianas o marinas vía aguas continentales (C), aguas de transición (E) o marinas (M).**

RUTA DE EXPOSICIÓN	MEDIO	ACTIVIDADES
Contacto dérmico.	C, E, M.	Actividades recreativas, contacto directo con la capa superficial, espuma o tapices de cianobacterias tóxicas.
	C, E, M.	Actividades recreativas o laborales con contacto directo con aguas en las que se ha producido un bloom, o haya toxinas libres.
	C.	Baño, ducha con agua tratada conteniendo bloom tóxico o toxinas libres.
Inhalación.	C, E, M.	Duchas, prácticas laborales, deportes acuáticos.
Ingestión de agua o espuma.	C, E, M.	Ingestión accidental de cianobacterias tóxicas.
	C	Bebida de aguas naturales en la que se ha producido un bloom o toxinas libres.
	C.	Bebida de aguas tratadas conteniendo bloom tóxicos o toxinas libres.
Ingestión de alimentos.	C, E, M.	Moluscos u otros productos de maricultura que contienen toxinas.
	C, E.	Consumo de productos vegetales si la toxina se acumuló por riegos en los vegetales.
Hemodiálisis.	C.	Exposición al agua de hemodiálisis conteniendo toxinas de cianobacterias.

Adaptado de Roset *et al.* (2001).

## 2.1. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE CONTACTO DÉRMICO

Anónimo (2002), menciona que la dermatitis cianobacteriana marina (picazón del nadador o dermatitis por algas) es una dermatitis severa que ocurre por el contacto luego de nadar en aguas marinas que contienen brotes de ciertas especies de cianobacterias marinas. Los síntomas de “picazón” y “quemadura” se producen al cabo de 3 a 8 horas, se desarrolla una dermatitis visible y enrojecimiento, seguidos de la aparición de ampollas y una descamación aguda.

Algunos componentes tóxicos tales como aplisiatoxina, lyngbyatoxina A y debromoaplisiatoxina, se han aislado de cianobacterias marinas; siendo altamente inflamatorias y fuertes compuestos promotores de tumores en la piel ya que usan mecanismos similares a ésteres de forbol al activar la proteína quinasa C (Roset *et al.*, 2001). Hasta la fecha, sólo se han reportado brotes de dermatitis por contacto dérmico en Japón y Hawai. La cianobacteria *Lyngbya majuscula* produce debromoaplisiatoxina y lyngbyatoxina A, mientras que las cianobacterias *Oscillatoria nigroviridis* y *Schizothrix calcicola* producen debromoaplisiatoxina (Anónimo, 2002).

## 2.2. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE INHALACIÓN

La inhalación de un aerosol de agua de mar que contiene fragmentos de células de dinoflagelados marinos o toxinas (brevetoxinas) liberadas en las olas por algas desintegradas, puede ser peligrosas para los seres humanos. Los signos y síntomas son irritación severa de la conjuntiva y membranas mucosas (especialmente la nariz) seguida de tos y estornudos constantes, así como comezón en los labios (Reguera, 2003).

Las brevetoxinas acumuladas en mariscos pueden causar envenenamiento por mariscos que causan neurotoxicidad y pueden matar peces, invertebrados, aves marinas y producir la muerte de manatíes y delfines. Estas son producidas por el dinoflagelado marino denominado *Gymnodinium breve*. Durante muchos años, estos brotes se reportaron sólo en el sudeste de USA y este de México, pero en 1993, la toxina neurotóxica del marisco (NSP) se detectó también en Nueva Zelanda (Fernández *et al.*, 1995).

### **2.3. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA INGESTIÓN DE AGUA O ESPUMA**

Algunas especies de cianobacterias pueden producir espumas densas con altas concentraciones de células. Las espumas producidas por las cepas toxicogénicas pueden contener elevadas concentraciones de toxinas ya que la mayoría de toxinas son intracelulares (Roset *et al.*, 2001). A diferencia de las áreas costeras, la formación de espuma es más frecuente en lagos durante el período de inactividad luego de las condiciones de surgencia. La existencia de espuma cianobacteriana producida por una especie toxicogénica representa un gran peligro para la salud humana (Anónimo, 2002).

*Nodularia spumigena* fue la primera cianobacteria conocida por sus efectos mortales sobre los animales. La toxina nodularina producida por *Nodularia spumigena*, es un pentapéptido cíclico que actúa como una hepatotoxina, ya que produce hemorragias masivas en el hígado de mamíferos, rompe la estructura del hígado y tiene ciertos efectos sobre los riñones (Roset *et al.*, 2001). La inhibición de fosfatos proteínicos de

serina – treonina representa el mecanismo de acción de la nodularina (Anónimo, 2002).

En el siglo XIX, se registraron varios brotes tóxicos y acumulaciones de *Nodularia spumigena* en USA. Los estudios hechos por Nehring (in Anónimo, 2002) tratan sobre brotes de *N. spumigena* asociados con el envenenamiento de patos, perros, vacas y ovejas. No se ha reportado envenenamientos de seres humanos por *Nodularia spumigena*; sin embargo, los seres humanos son tan susceptibles a las toxinas como el resto de mamíferos; por lo que se debe de tener un cuidado particular en los niños pequeños ya que pueden ingerir accidentalmente materias tóxicas en cantidades que podrían traer graves consecuencias tales como daño al hígado, el cual no se diagnostica inmediatamente (Fernández et al., 1995).

El único caso registrado de intoxicación a nivel de Suramérica es el suscitado en Caruaru (Brasil), donde numerosos pacientes renales sometidos a diálisis murieron de intoxicación por sustancias hepatotóxicas segregadas por cianobacterias que habían desarrollado densas floraciones en los embalses de agua (Reguera, 2002).

#### **2.4. EXPOSICIÓN ATRAVÉS DE LA INGESTA DE ALIMENTOS**

Está constituyen en una gran cantidad de organismos acuáticos bioacumuladores de toxinas, que serán estudiados con mayor detalle en el capítulo cuatro.

### III. MAREAS ROJAS

Los registros de intoxicaciones de seres humanos por consumo de peces y mariscos o por contacto accidental con organismos marinos datan de la antigüedad. Se sostiene que probablemente el registro más antiguo de los efectos tóxicos de microalgas aparece en el Antiguo Testamento (Éxodo 7: 19-21; 1491 a.C.), donde las aguas de Egipto se transformaron en “sangre”, produciendo la muerte masiva de peces y su respectiva descomposición en las orillas (Reguera, 2003).

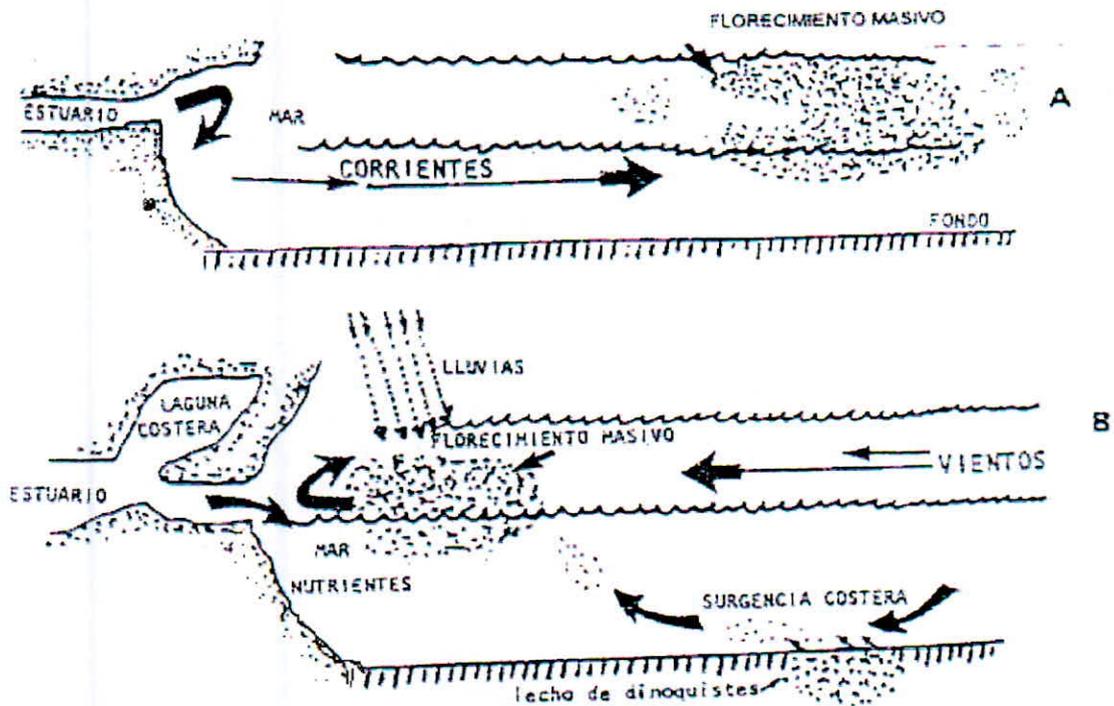
Suárez & Guzmán (??), mencionan que la explicación científica de estos fenómenos esperó uno de los desarrollos técnicos más importantes del milenio pasado la invención del microscopio óptico de Anthony van Leewenhoek, con el cual se describe a los microorganismos marinos en 1676. Debieron pasar más de 200 años de estudios descriptivos hasta que Alexander Von Humboldt interesado en los trabajos de C. Ehrenberg, descubrió que las rocas de origen marino como yesos y diatomitas estaban compuestas por cantidades astronómicas de restos esqueléticos diminutos que en ese momento se asociaron a organismos prehistóricos en miniatura (Reguera, 2003).

El naturalista Joseph Cooker en su expedición a la Antártica en 1847, examinó aguas verdosas y residuos barrocos depositados sobre masas de hielo y descubrió a las diatomeas, especulando que por su inmensa cantidad, “ellas probablemente mantienen en los océanos polares, el balance entre los reinos animal y vegetal que prevalecen sobre el planeta”. En 1847 el naturalista danés A. S. Oersted confirma el anterior hallazgo y pronto se hace evidente la presencia de microorganismos marinos en todos los cuerpos de aguas, incluidos los de agua dulce, y su capacidad de proliferar en inmensas cantidades en

condiciones ambientales favorables. En 1887 Victor Hensen define el concepto "plancton" como "todo aquello que se mueve en el agua, arriba o abajo, muerto o vivo". Más tarde el término fue restringido a los organismos marinos de pequeño tamaño, animales o vegetales, que viven en el agua y que por lo limitado de sus mecanismos natatorios son acarreados por las mareas y corrientes (Reguera, 2003; Suárez & Guzmán, ??).

Gómez (1996), menciona que los primeros conceptos que se tenía sobre la formación de las "mareas rojas" eran semejantes a los considerados para la formación de florecimientos o *blooms*, deduciendo que las "mareas rojas" eran inducidas por los nutrientes, principalmente fosfatos: estos excedentes de nutrientes se suministraban por las bocas de esteros, ríos, principalmente durante la época de lluvias, cuyos escurrimientos proveían el sustrato suficiente para mantener la "marea roja"; también se considera a las surgencias que acarrear importantes cantidades de nutrimentos a la superficie, dándose súbitas "explosiones" de fitoplancton (fig. 1A).

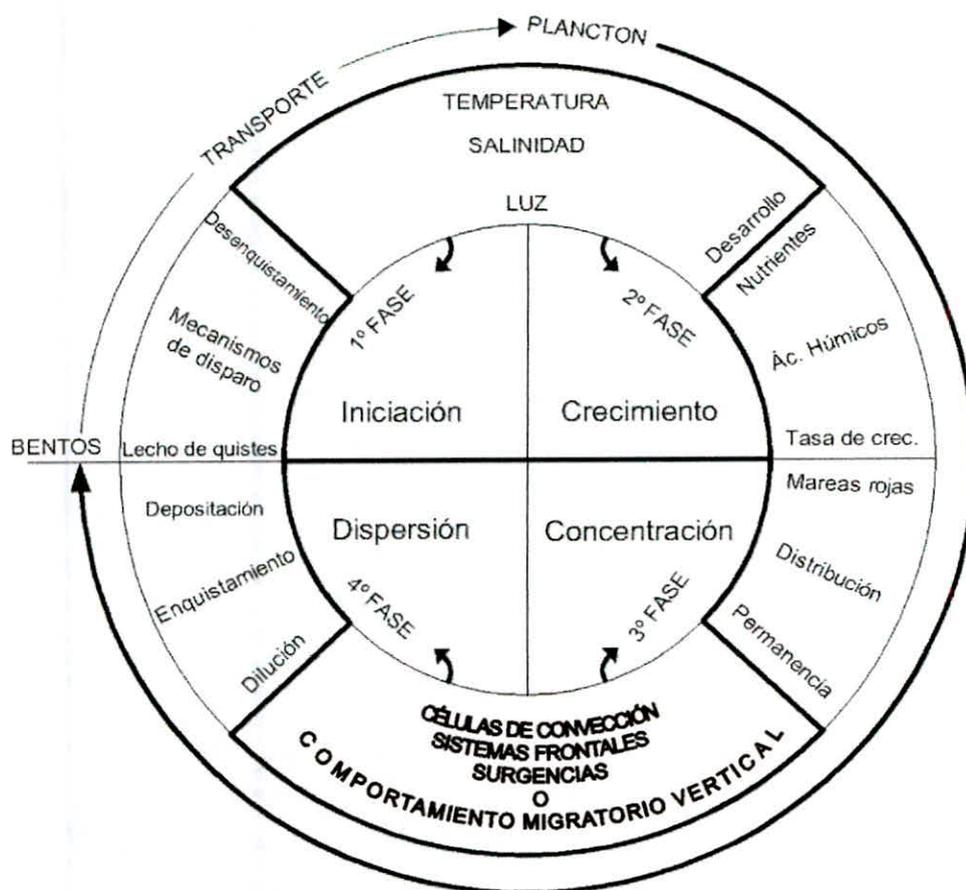
Las mareas rojas también fueron asociadas a los vientos y lluvias, ya que los vientos generaban surgencias en las regiones costeras, lo que representa un elemento esencial en la proliferación del plancton. Las lluvias, por su parte, arrastran elementos importantes en los mecanismos de disparo de las "mareas rojas", como el fierro. Las investigaciones demostraron que había un crecimiento normal ( $1 \text{ div.} \times \text{día}^{-1}$ ) más que una "explosión masiva", y que esto se debería referir en términos de concentración (fig. 1 B).



Tomado de Gómez (1996).

**Fig. 1.** Conceptos históricos sobre el desarrollo de mareas rojas. A) nutrientes = marea roja. B) nutrientes (soporte y mantenimiento) + corrientes (concentración) = marea roja.

El concepto más reciente de la dinámica de las mareas rojas para dinoflagelados se debe principalmente a las investigaciones hechas por Steidinger (1975 – 1983), quién identificó una serie de fases o etapas comunes en la mayoría de los eventos de mareas rojas, llegando a integrar los diferentes elementos que influyen de manera coadyuvante en la formación de las mareas rojas. Esto implica un fenómeno cíclico, dividido en cuatro fases (fig. 2): iniciación, crecimiento, concentración y dispersión (círculo central). De estas etapas, la más conocida es la tercera o de concentración, debido a que es la única reconocida visualmente porque imprime la discoloración del agua. La información que se presenta es de una marea roja por dinoflagelados, no llegando a generalizarse para todos los eventos de marea roja (Gómez, 1996).



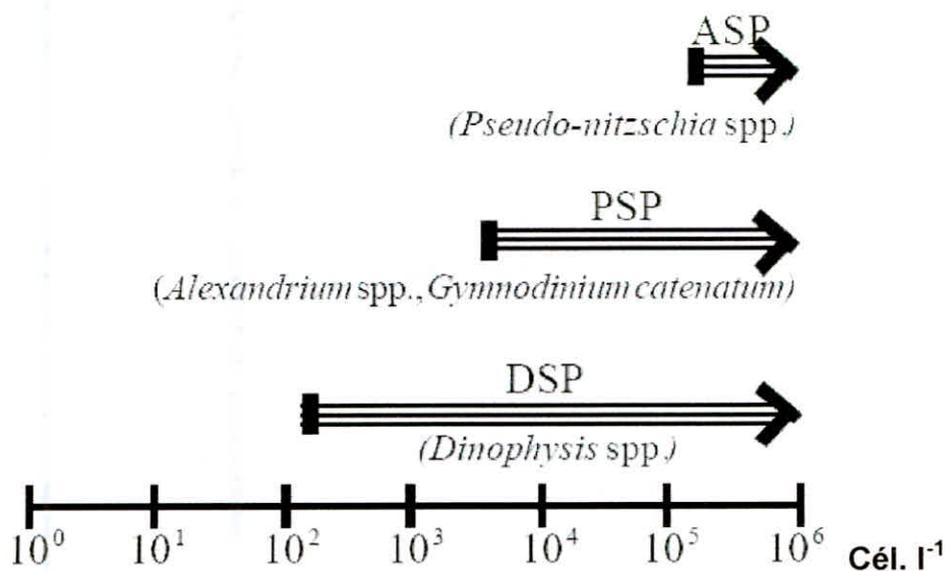
Tomado de Gómez (1996).

Fig. 2. Concepto actual de marea roja por dinoflagelados según Steidinger, involucra cuatro fases de desarrollo (círculo central). Factores físicoquímicos (círculo medio) y transporte cíclico: bentos-plancton-bentos (círculo externo).

**Fase de iniciación.** Implica la existencia de un "lecho de quistes" de resistencia en la fase béntica; además se considera que todos los dinoflagelados de tipo nerítico – estuarino presentan en su ciclo de vida un estadio planocigoto (dinoquiste con movimiento) o hipnocigoto (dinoquiste sin movimiento y cubierta de resistencia); siendo ambos estados celulares diploides (2N) (Gómez, 1996). Suárez & Guzmán (??), mencionan que deben de existir condiciones apropiadas de temperatura, salinidad, luminosidad y algunos elementos que actúan en los mecanismos de disparo como el nitrógeno, fósforo, fierro, magnesio y vit. B<sub>12</sub>.

**Fase de crecimiento.** Es la considerada como de "soporte y mantenimiento", debido a que son los nutrientes las sustancias básicas para mantener la población de la "marea roja". La permanencia de la "marea roja" será proporcional a la cantidad de nutrimentos disponibles en el ambiente como son las concentraciones de fósforo y nitrógeno (Buschmann, 2005). Gómez (1996), hace mención que la existencia de ácido húmico y fúlvico favorecen el crecimiento de los dinoflagelados (fig. 2). Suárez & Guzmán (??), consideran que la tasa de crecimiento es "normal" ( $1 \text{ div.} \times \text{ día}^{-1}$ ), en la especie dominante de la marea roja sin embargo, ésta puede llegar a  $2 \text{ div.} \times \text{ día}^{-1}$ , si es que los vientos son suaves o están ausentes, así como la presencia de una marcada estratificación de las corrientes de agua. A estas dos primeras fases le son comunes los factores de temperatura, salinidad e intensidad luminosa, para la sustentación de la marea roja.

**Fase de concentración.** Es la más conocida por ser la única visible del fenómeno y es donde recae la mayoría de las investigaciones. Aquí es donde se alcanza la máxima densidad de la especie dominante de la marea roja, supeditada por los factores ambientales y el soporte de nutrientes, que es lo que permitirá su prolongada o efímera existencia (Suárez & Guzmán, ??). También permitirá su extensión en espacio coadyuvado por el sistema de circulación imperante en el área o región. La evaluación de la densidad celular y el tiempo que permanece la marea roja en determinada área, varía con las diferentes especies (fig. 3), abarcando desde  $5 \times 10^5 \text{ cél. l}^{-1}$  hasta  $5 \times 10^7 \text{ cél. l}^{-1}$  (Reguera, 2002; Scogins, 1998).



Tomado de Reguera (2002).

**Fig. 3.** Rango de concentraciones celulares de microalgas planctónicas tóxicas dentro de los cuales se manifiesta la presencia de toxinas en los bivalvos.

**Fase de dispersión.** Es la menos conocida y parece ser que los mismos factores físicos que la concentran también la abaten o diluyen. En esta etapa muchos dinoflagelados entran en una fase de vida inmóvil (quistes), muy resistentes posiblemente por los factores climáticos adversos. Los dinoquistes van al fondo para formar un "lecho de quistes" latentes que reiniciará en un futuro una nueva marea roja (Suárez & Guzmán, ??). Estas dos últimas etapas (fig. 2), tienen en común los procesos físicos de concentración, circulación de Langmuir, sistemas frontales o bien la migración vertical en zonas o frentes que delimitan espacios de surgencias (Gómez, 1996).

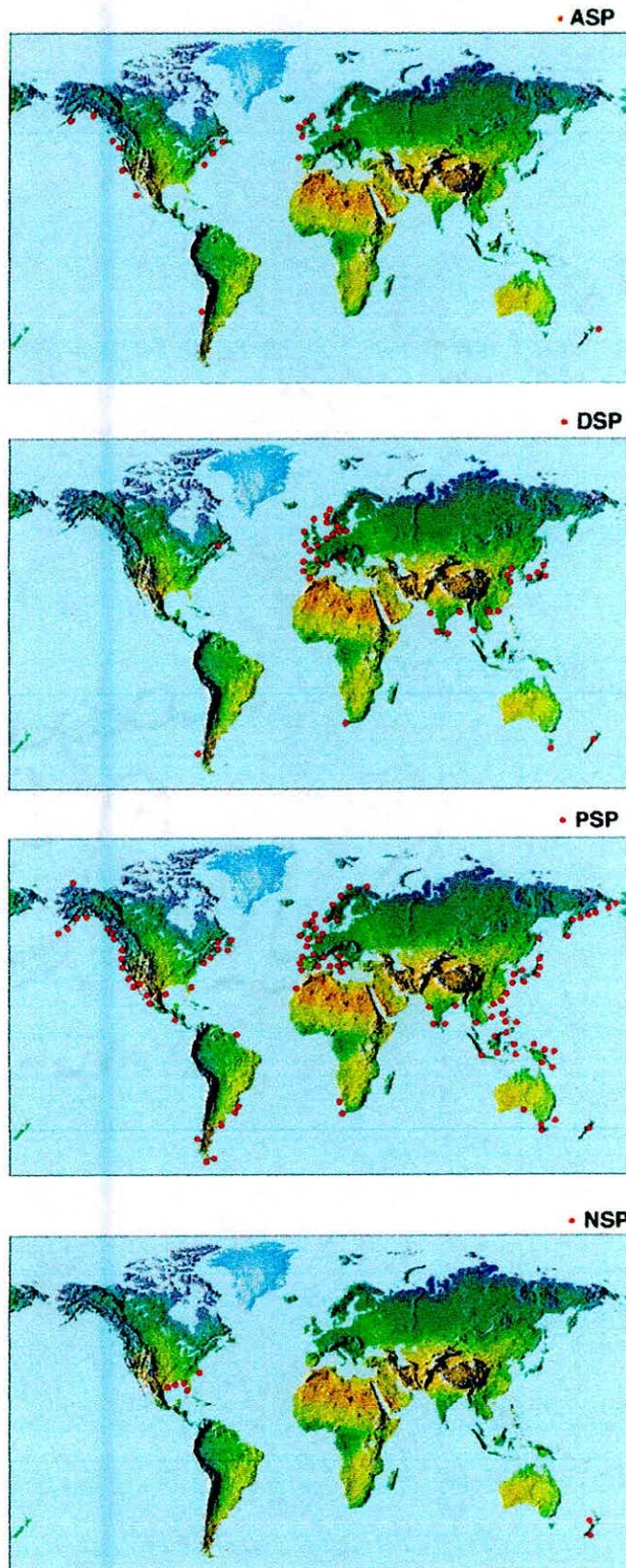
Las mareas rojas si causan daño, se les considera como floraciones de algas nocivas (FAN) y éstas están dadas por un grupo poco numeroso de especies de microalgas. En estas FAN se ha observado la participación de tan solo unas 80 especies de alrededor de las 4000 conocidas. Entre los principales organismos causantes se encuentran dinoflagelados, diatomeas y

cianobacterias. Estas especies producen en su metabolismo compuestos químicos de muy alta toxicidad denominados ficotoxinas (Suárez & Guzmán, ??).

El registro más antiguo de intoxicación por toxinas marinas data en Japón en el año de 1976, en la que muchas personas sufrieron problemas de intoxicación, causada por una toxina que originó diarrea en los seres humanos (Reguera, 2003). En el año de 1987, se suscitó en las islas de Príncipe Eduardo de Canadá, una gran intoxicación producto de una toxina conocida como toxina amnésica del marisco que causó la muerte de tres personas y más de cien personas con intoxicación aguda por consumo de mejillones *Mytullis edulis* (San Millan & Ibáñez, 1981).

Desde estos primeros registros que se dieron en Europa se han venido incrementando las FANs a nivel mundial, siendo mayores durante las dos últimas décadas, la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las floraciones de algas perjudiciales (fig. 4), así como la de los compuestos tóxicos presentes en la cadena alimentaría marina (FAO, 2005).

Se han ofrecido diferentes explicaciones para el incremento de las FAN, señalándose entre otras, el mayor conocimiento a nivel científico de las especies de algas tóxicas, una mayor utilización de las aguas costeras en acuicultura, la transferencia de mariscos de una zona a otra, la eutroficación cultural por aguas domésticas, industriales y de desechos agrícolas, mayor movilidad de las sustancias húmicas y los metales traza desde el suelo por deforestación y/o precipitaciones ácidas (lluvia ácida), y condiciones climáticas poco comunes (Hallegraeff & Hara, 1995).



Tomado de Chávez *et al.* (2005).

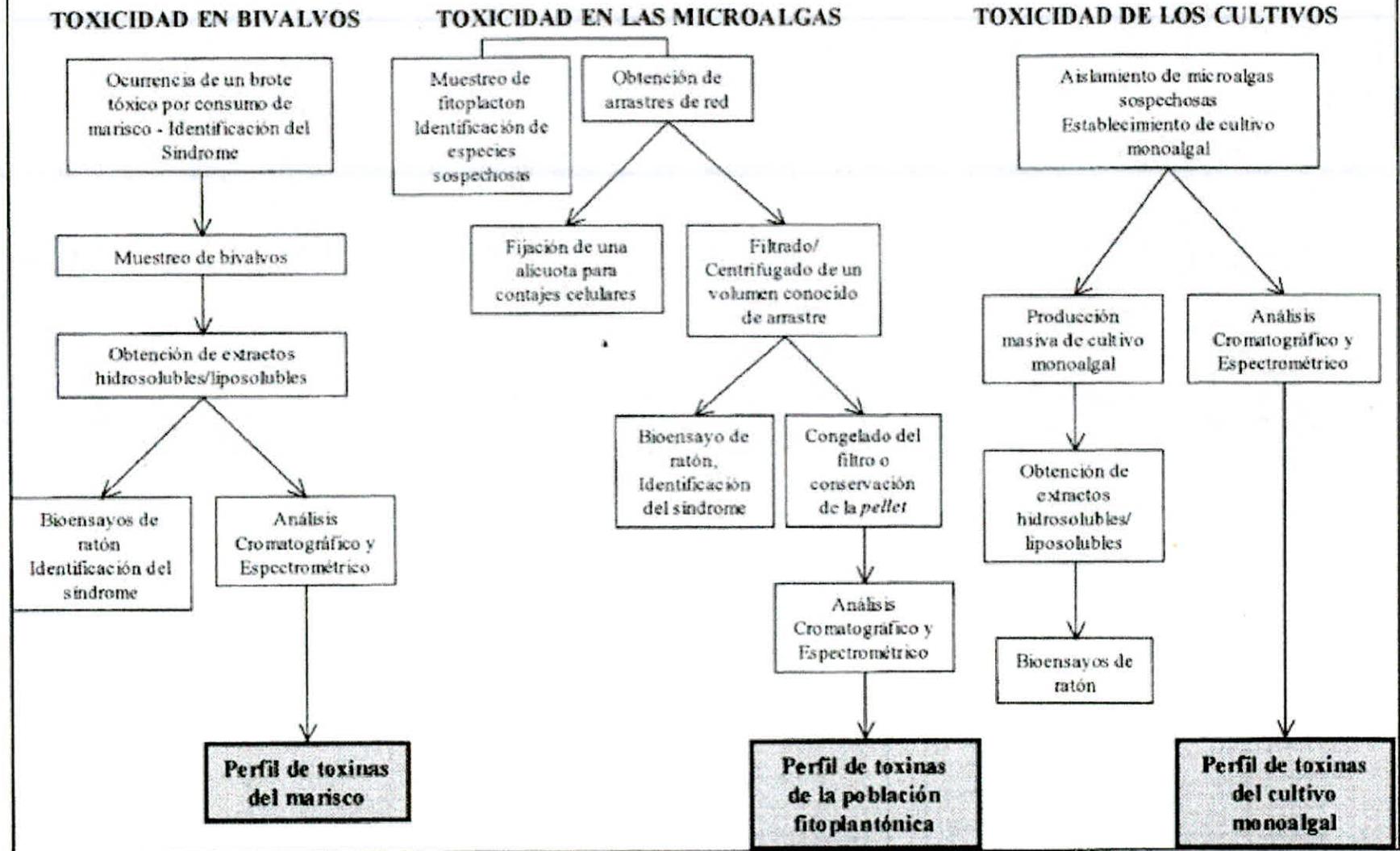
**Fig. 4. Distribución de las diferentes FAN a nivel mundial en las últimas décadas.**

Reguera (2003) sostiene, que para determinar si la marea roja es tóxica se debe de monitorear la toxicidad en los moluscos bivalvos, en las microalgas de la zona y también los moluscos en los medios de cultivo, llegando a plantear el esquema que se muestra en la figura 5 para encontrar el perfil de la toxina.

Buschmann (2005), menciona algunos estudios realizados (tabla 3) por diferentes autores en los que se observan los efectos de la eutrofización en la formación de FAN a nivel mundial. Hoy en día se está realizando la vigilancia de las diferentes especies tóxicas de algas tales como dinoflagelados y cianofitas en diversas zonas costeras del mundo como en Europa, Japón, USA, etc.

Los compuestos producidos por las FAN, en su mayoría son resistentes al calor de la cocción habitual y pueden interferir, en muy bajas concentraciones, con procesos fisiológicos normales como la conducción de los impulsos nerviosos, la absorción de agua y de alimentos en el intestino o el procesamiento de la memoria (Buenadicha, 2006). De acuerdo a sus efectos tóxicos estos compuestos se han clasificado como: intoxicación paralizante por moluscos (PSP), intoxicación diarreica por moluscos (DSP), intoxicación neurotóxica por moluscos (NSP) e intoxicación amnésica por moluscos (ASP) (Fernández *et al.*, 2002). La PSP y la DSP pueden presentarse en Europa, mientras que la NSP y ASP se producen normalmente en el continente americano, Golfo de México y Canadá. La PSP produce sintomatología principalmente nerviosa, siendo una intoxicación con una elevada mortalidad. La DSP es una intoxicación leve que causa una sintomatología gastrointestinal, mientras que la ASP y NSP producen síntomas gastroentéricos y nerviosos (Correa, 2006).

# IDENTIFICACIÓN INEQUÍVOCA DEL AGENTE DE UN EPISODIO TÓXICO



Tomado de Reguera (2003).  
Fig. 5. Pasos que se debe de seguir para identificar de forma inequívoca las posibles toxinas marinas.

**Tabla 3. Estudios de los efectos de la eutrofización en la formación y aumento de las mareas rojas en todo el mundo.**

GRUPO TAXONÓMICO	OBSERVACIÓN (CAUSAS) FAN	LUGAR	REFERENCIA
<i>Alexandrium</i> spp.	Acentuación de la dispersión geográfica debido al transporte de quistes	Europa Norte América Japón Sudeste Asiático Sur América Mediterráneo	Hallegraf (2003) Villa <i>et al.</i> (2001) Molinet <i>et al.</i> (2003) Córdova <i>et al.</i> (2003) Sebastián (2005) Smayda (1990)
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Aumento de nitratos	Costa de Louisiana	Parsons <i>et al.</i> (2002) Turner & Rabalais (1991)
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Aumento concentraciones de N y P	California	Kudela <i>et al.</i> (2002)
<i>Phaeocystis</i> spp.	Carga de nutrientes	Mar del Norte	Rousseau <i>et al.</i> (2002)
Cianobacterias	Carga de nutrientes	Costas y bahías de Brasil	Ferrao (2002) Filho <i>et al.</i> (2002)
<i>Nodularia</i> spp.	Aumento concentraciones de N y P.	Australia	Lukatelich & McComb (1986)
<i>Pfisteria</i> spp.	Aumento concentraciones de N y P	Carolina del norte	Burkholder & Glasgow (1997)
FAN	Aumento concentraciones de N y P	Adriático Norte. Mar Negro	Bodeman (1993) Moncheva <i>et al.</i> (2001)
FAN	Aumento concentraciones de N/P y P/Si.	Laboratorio	Anderson <i>et al.</i> (1997)
FAN	Aumento concentraciones de N y P	Laboratorio	Trell <i>et al.</i> (1997)

Adaptado de Buschmann (2005).

Reguera (2002), menciona que las mareas rojas en el Cono Sur Americano, al igual que en otras regiones del mundo, se han citado al menos desde la época de las grandes campañas oceanográficas del siglo XIX. Avaria (1979), en su revisión de episodios en las costas chilenas, cita las observaciones de Charles Darwin, quién a bordo del B.O. "Beagle", observó franjas de agua color fango. Hoy sabemos que los frentes marinos, las de circulación de Langmuir y otras zonas de convergencias constituyen lugares óptimos para la acumulación de organismos planctónicos nadadores que de esta forma originan manchas y franjas que colorean el mar. Por ello, abundan las citas de manchas de dinoflagelados (*Prorocentrum micans*, *Noctiluca* spp.) y ciliados (*Mesodinium rubrum*) observadas durante campañas oceanográficas en la región de afloramiento (surgencia) del Perú y norte de Chile, y en zonas frontales de la plataforma Argentina. No existen pruebas de que estas mareas rojas fueran tóxicas, pero en ocasiones se han asociado con peces muertos (por causas desconocidas) en playas de la región del Callao (Perú).

En la tabla 4, se presenta una lista de las principales especies de microalgas nocivas en el Cono Sur. Estas especies han sido identificadas, en algunos casos, como los agentes inequívocos de los eventos tóxicos. En otros casos, su proliferación ha sido asociada con la ocurrencia de un evento tóxico, pero queda pendiente la demostración inequívoca de su toxicidad tras el aislamiento de las cepas, establecimiento de cultivos monoalgales y posterior análisis de los extractos celulares (Reguera, 2002).

**Tabla 4. Principales especies microalgales asociadas con la aparición de eventos tóxicos en el Cono Sur Americano.**

TOXINAS	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	COMENTARIOS
PSP	<i>Alexandrium catenella</i>	Sur de Chile (Regiones X-XII). Canal de Beagle.	Principal agente de episodios de PSP en Chile. Causante de víctimas humanas.
	<i>Alexandrium tamarens.</i>	Argentina (costa Marplatense y Patagonia) y Uruguay.	Principal agente de PSP en Argentina y Uruguay. Causante de víctimas humanas.
	<i>Alexandrium fraterculus</i>	Sur de Brasil, estuario de La Plata.	Sospechoso de causar episodios PSP en Uruguay. Toxicidad no demostrada.
	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Sur de Brasil, Uruguay, norte de Argentina.	Agente de episodios moderados de PSP en Uruguay y Argentina.
DSP	<i>Dinophysis cuta</i>	Región de los fiordos chilenos.	Principal agente de DSP en Chile.
	<i>Dinophysis acuminata</i>	Todo el cono sur.	Asociado con episodios de DSP en Uruguay, y con presencia de toxinas diarreicas en Brasil y norte de Argentina.
	<i>Dinophysis caudata</i>	Sur de Brasil. Uruguay.	Asociado con presencia de toxinas diarreicas en Brasil y Uruguay.
ASP	<i>Pseudos-nitzchia australis</i>	Chile y norte de Argentina.	Agente de episodios ASP en Chile, asociado con presencia de toxinas ASP en Argentina.
	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Todo el cono sur.	Toxinas detectadas en cultivos de cepas chilenas.
Mortalidad de organismos marinos	<i>Heterosigma akashiwo</i> <i>Karenia cf. mikimotoi</i>	Fiordos chilenos.	Muertes masivas de salmones en Chile.
	<i>Fibrocapsa japonica</i>	Sur de Brasil.	Mortandad de peces.
Microsistinas y Hepatotoxinas	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Aguas continentales y lagunas costeras de Brasil.	Muertes humanas. Intoxicaciones de organismos marinos.
	<i>Synechocystis acuatilis</i>	Sur de Brasil.	Mortandad de peces.

Fuente: Reguera (2002).

Suárez & Guzmán (??) mencionan que en Chile se presentan 2000 casos de intoxicaciones humanas al año, con una mortandad asociada del 15%; las que frecuentemente son causadas por dinoflagelados (tabla 5). Debido a la gran cantidad de intoxicaciones que presenta Chile, en nuestro país se debe de implementar monitoreos rigurosos de las FAN, como medidas preventivas de posibles intoxicaciones.

La información sobre mareas rojas en el litoral peruano, se registró por primera vez en el año de 1828 en la zona del Callao. Éstas tienden a ser catalogadas como inocuas, es decir no tóxicas, pero llegan a producir efectos negativos como la mortandad de los organismos filtradores por obstrucción y daño de las branquias por la alta densidad celular (Vera *et al.*, 1999).

Los laboratorios costeros de IMARPE situados en Pisco, Huacho, Chimbote, Santa Rosa y Paita monitorean e indican un incremento en la frecuencia de las mareas rojas en gran parte de la costa peruana (Sánchez, 2007), encontrándose siempre el dinoflagelado *Gymnodinium sanguineum* (*Akashiwo sanguinea*) en concentraciones de hasta  $18 \times 10^6$  cél. l<sup>-1</sup>. Esta especie también se registra en Chérrepe – Lambayeque, Pisco y Callao (IMARPE, 2006; IMARPE, 2007; ITP, 2006; ITP, 2007), no llegando a encontrarse actividad toxica PSP en microalgas; como si ocurre en nuestro país vecino de Chile.

Tabla 5. Síndromes de intoxicaciones causadas por toxinas marinas en Chile.

INTOXICACIÓN	VENENO PARALIZANTE DE LOS MARISCOS (VPM)	VENENO DIARREICO DE LOS MARISCOS (VDM)	VENENO AMNÉSICO DE LOS MARISCOS (VAM)	VENENO NEUROTÓXICO DE LOS MARISCOS (VNM)
Organismo causante (en Chile).	Dinoflagelados pelágicos ( <i>A. catenella</i> ).	Dinoflagelados pelágicos ( <i>Dinophysis acuta</i> ).	Diatomeas ( <i>Pseudonitschia</i> ).	Dinoflagelados pelágicos o béticos.
Transvector principal (en Chile).	Mariscos.	Mariscos.	Mariscos.	Mariscos.
Distribución geográfica.	Mundial, aguas templadas y tropicales.	Mundial, aguas templadas.	Canadá, Noroeste de USA, sur de Chile.	Golfo de México y Nueva Zelanda.
Toxinas principales (número).	Saxitoxinas (22+).	Ácido okadaico y derivados (8+).	Ácido domoico (3+).	Brevetoxinas (10+).
Acción fisiológica.	Bloqueadores de canales de sodio.	Inhibición de proteína fosfatasa.	Agonista de receptores de glutamato del sistema nervioso central.	Activador de canales de sodio.
Tiempo de incubación.	2-60 min.	Horas.	Horas.	30 min. a 3 h.
Duración.	48 horas.	Días.	Años.	48 horas.
Síntomas agudos.	Parestesias, depresión respiratoria y cardiaca, parálisis progresiva, coma, muerte.	Diarrea, náusea, vómitos, no letal.	Náuseas, diarrea, vómitos, parestesias, depresión respiratoria, pérdida de la memoria.	Náusea, vómitos, diarrea, broncoconstricción, baja de presión.
Síntomas crónicos.	No tiene.	No se conocen.	Pérdida de la memoria.	No tiene.
Tasa de mortalidad.	1-14 %	0%	3%	0%
Diagnóstico.	Síntomas clínicos, bioensayos, radioensayos, HPLC-FD.	Síntomas clínicos, bioensayos, ensayo bioquímico HPLC-FD.	Síntomas clínicos, radioensayo, HPLC-UV.	Síntomas clínicos, bioensayos, test ELISA.
Terapia.	Apoyo respiratorio, diuréticos.	Apoyo, hidratación.	Apoyo respiratorio.	Apoyo.
Prevención.	Vigilancia, vedas cautelares, difusión.	Vigilancia, vedas cautelares, difusión.	Vigilancia, vedas cautelares, difusión.	Vigilancia, vedas cautelares, difusión.

Adaptado de Suárez & Guzmán (?).

Otros eventos muy puntuales se han observado en las bahías de Paita y El Ferrol. El organismo responsable en la primera bahía fue el dinoflagelado *Ceratium furca* asociado a *Protoperdinium crassipes*, *Dinophysis acuminata*, *C. dens*, *C. fusus*, *Protoperdinium longispinum* y la diatomea *Pseudo-nitzschia* cf. *delicatissima*. Mientras que en la segunda bahía fue *Ceratium dens* asociado a *C. tripos*, *C. furca* y *Dinophysis caudata*, entre otros (Sánchez, 2007). A todo esto se debe tener cuidado con las descargas producto de las actividades humanas no controladas ya que éstas pueden incrementar la frecuencia de las FAN que se presentan normalmente en el Perú, ya que es sólo cuestión de tiempo para que se susciten otras intoxicaciones a las que normalmente tenemos, siendo la más común la intoxicación diarreica del marisco (DSP) (Anónimo 2001; IMARPE, 2005; IMARPE, 2007; Sánchez, 2007).

En el Perú los análisis de los productos hidrobiológicos están a cargo del Instituto Tecnológico Pesquera quienes controlan los límites permisibles de las biotoxinas en los productos de origen marino, basados en el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo (CE) N° 853/2004 (Tabla 6), quién establece las normas específicas de higiene en los productos alimenticios de origen animal, llegando a garantizar un elevado nivel de protección a los consumidores.

**Tabla 6. Valores máximos de concentración de toxinas según el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo N° 853/ 2004.**

TOXINAS	CONCENTRACIÓN
<b>PSP</b>	80 µg 100 g <sup>-1</sup> de Satitoxina
<b>DSP</b>	16 µg 100 g <sup>-1</sup> de Ac. Okadaico
<b>YTX</b>	100 mg 100 g <sup>-1</sup>
<b>ASP</b>	2 mg g <sup>-1</sup> Ac. Domoico

Fuente: Reglamento (CE) del Parlamento Europeo y del Consejo (2004).

En el Perú la Resolución Ministerial N° 730 – 2003 – SA/DM establece los límites permisibles de biotoxinas en los moluscos a exportar (tabla 7). Asimismo el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP), por medio del Programa Control de Moluscos Bivalvos Vivos del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera del ITP (SANIPES – ITP), con apoyo del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), se encargan de monitorear las aguas costeras con concesiones para la maricultura con una periodicidad quincenal; los datos obtenidos son reportados de forma cuantitativa y las especies mas dominantes de microalgas existentes en los cuerpos de agua marinos.

**Tabla 7. Valores máximos de concentración de biotoxinas según Resolución Ministerial N° 730 – 2003 – SA/DM.**

<b>TOXINAS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>PSP</b>	80 $\mu\text{g}$ 100 $\text{g}^{-1}$ de Satitoxina
<b>DSP</b>	Ausencia
<b>YTX</b>	Ausencia
<b>ASP</b>	2mg 100 $\text{g}^{-1}$ Ac. Domoico

Fuente: Resolución Ministerial 730 – 2003 – SA/DM.

#### IV. CLASIFICACIÓN DE BIOTOXINAS MARINAS

La intoxicación por consumo de mariscos es causada por un grupo de toxinas elaboradas por algas planctónicas (dinoflagelados) que en la mayoría de casos constituyen parte de la alimentación de los moluscos bivalvos que se nutren por filtración, como mejillones, ostras o vieiras. La toxina se acumula en la fracción comestible de éstos, con el problema adicional de que pueden persistir al proceso de depuración de los moluscos (Fernández *et al.*, 2002).

Las toxinas generadas por dinoflagelados (ficotoxinas) son compuestos químicos que en comparación con otras toxinas naturales son de bajo peso molecular, de naturaleza no proteica muy estables al calor; debido a esto los procesos de cocción, ahumado, secado y salado no las destruyen (Suárez, 2004).

Las ficotoxinas comprenden un amplio espectro de sustancias de estructura molecular, mecanismos de acción y actividad biológica muy diversa. Los síndromes asociados a la acumulación de estas ficotoxinas son: la intoxicación paralizante por moluscos (PSP), intoxicación diarreica por moluscos (DSP), intoxicación neurotóxica por moluscos (NSP) e intoxicación amnésica por moluscos (ASP) (FAO, 2005; Fernández & Diógenes, ??; Hernández, 1996).

##### **4.1. TOXINA AMNÉSICA DE MOLUSCO (ASP: “AMNESIC SHELLFISH POISONING”)**

La intoxicación amnésica por mariscos (ASP) fue reconocida por primera vez en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo (Canadá), en donde causó tres muertes y más de cien casos de intoxicación aguda en seres humanos por la ingestión de cholgas (*Mytilus edulis*). Entre los síntomas se incluían:

náuseas, vómitos, desorientación y pérdida de la memoria a corto plazo (amnesia), de lo cual deriva su nombre (Fernández & Diógenes, ??; Hernández, 1996).

La amnesia no se manifiesta en todos los casos, por lo cual también es conocida como intoxicación por ácido domoico (ASP). Es el ácido domoico (DA), la biotoxina causante del envenenamiento y es producida por ciertas especies de diatomeas (Correa, 2006).

En la actualidad, el Reglamento Internacional (CE) N° 853/2004, establece el límite de 20 mg de DA por kg de tejido de molusco (cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado).

#### a. Estructura química y propiedades

El DA, un amino ácido que, en su estado puro, aparece como cristales incoloros en forma de agujas. Es soluble en agua, ácidos minerales diluidos en disoluciones de hidróxidos alcalinos; ligeramente soluble en metanol y etanol e insoluble en éter de petróleo y benceno (FAO, 2005).

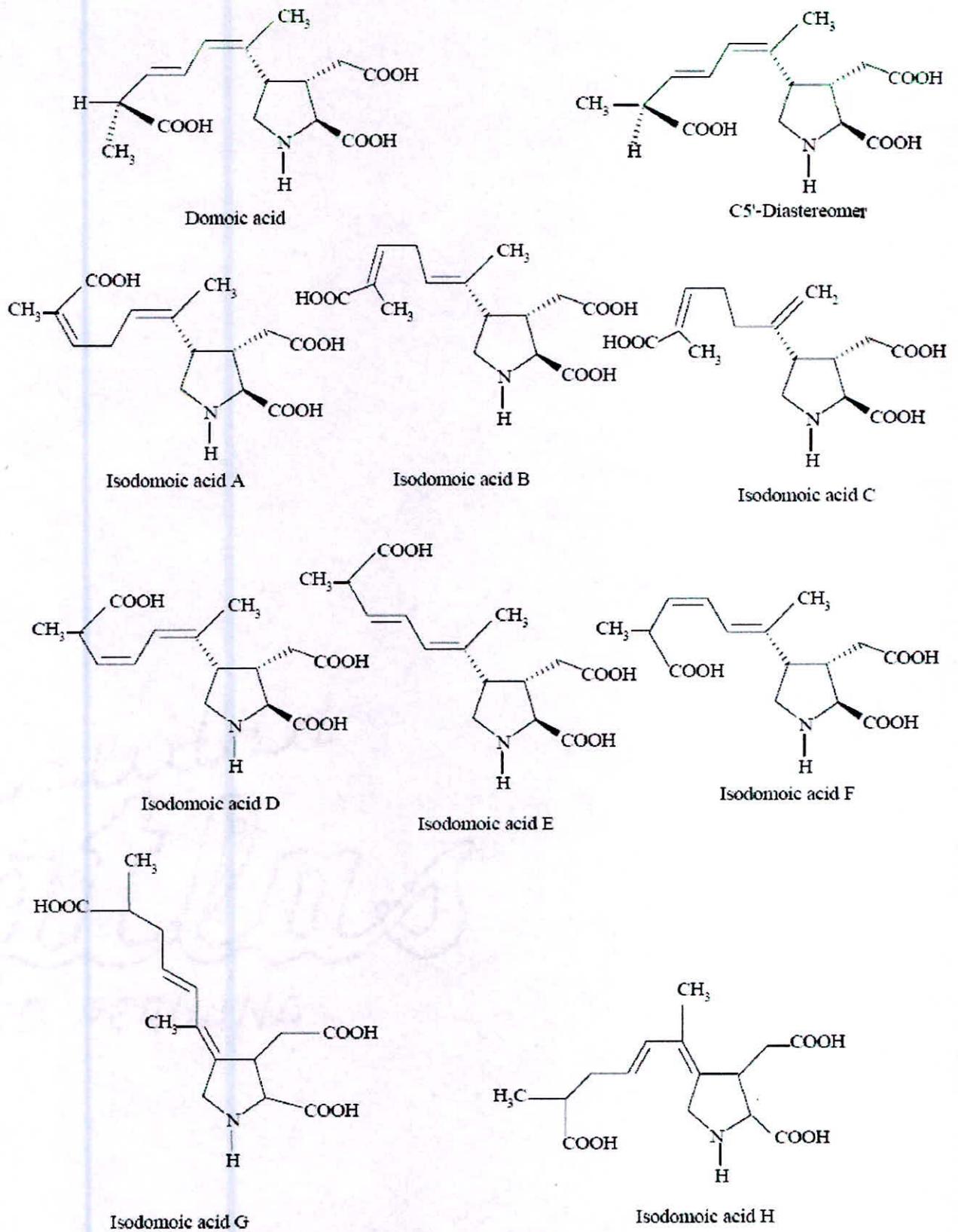
Compuesto natural perteneciente a la categoría de los cainoides aislados de diversas fuentes marinas, incluidas las macro y microalgas. El DA es un amino ácido cristalino, que puede purificarse por diversos métodos cromatográficos y su detección se facilita por espectroscopia UV por poseer un cromóforo fuerte (Correa, 2006). Originalmente el DA fue descubierto como un producto de una macroalga roja, *Chondria armata*, y aislado posteriormente de otras varias microalgas rojas. El origen del DA en las Islas Príncipe



Eduardo fue la diatomea *Pseudonitzschia* (antes *Nitzschia*) *pungens* forma *multiseries*. El DA es una potente neurotoxina, que se une a proteínas receptoras específicas en las neuronas, causando su despolarización continuada hasta la ruptura celular (Wright & Quilliam, 1995).

La investigación de los cainoides presentes en *Chondria armata* resultó en el descubrimiento, en cantidades pequeñas, de los isómeros geométricos del ácido isodomoico A, B y C (fig. 6), así como de domoilactonas (FAO, 2005). Ninguno de estos isómeros, encontrados en algas, se detectó en extractos de plancton o de tejido de mariscos (Buenadicha, 2006), sin embargo, se aislaron otros tres isómeros geométricos (ácido isodomoico D, E y F) y el diastereomero C5' tanto de células de plancton como de tejido de mariscos (FAO, 2005; Yasumoto *et al.*, 2001).

Los isómeros geométricos (ácido isodomoico D, E y F), se pueden preparar en el laboratorio exponiendo brevemente soluciones diluídas a luz UV, siendo por tanto considerados como productos *de novo* del plancton (Suárez, 2004). Los estudios farmacológicos indican que estos fotoisómeros se unen menos fuertemente con las proteínas receptoras del cainato que el propio DA. El calentamiento acelera la formación del diastoisómero C5, que posee casi la misma capacidad de unión con el receptor cainato que el propio DA. Estudios hechos por Zaman (*in* FAO, 2005) informaron acerca de dos nuevos isómeros de DA del alga roja *Chondria armata*, el ácido isodomoico G y H (fig. 6).



Tomado de FAO (2005).

**Fig. 6. Estructura química del ácido domóico y sus isómeros.**

**b. Organismos y condiciones favorables**

El DA fue aislado originalmente en la década de los años 1950 de la macroalga roja *Chondria armata*. Dos décadas más tarde, fue detectado en la macroalga roja del Mediterráneo *Alsidium corallinum* y en la diatomea *Amphora coffaeiformis* (FAO, 2005).

Se supuso que el origen del DA, en el primer incidente con ASP de 1987 en las Isla Príncipe Eduardo fue la macroalga roja *Chondria armata*. No obstante, la diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* fue señalada como productora del DA y la culpable del brote de intoxicación en los humanos, ya que se determinó que las “cholgas” de los cultivos de *Mytilus edulis* se hallaban contaminados con fragmentos identificables de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*, lo que causó la muerte de tres personas en la isla (Correa, 2006).

Desde el primer incidente con ASP en Canadá, se ha estudiado intensamente la ecología de *P. pungens* f. *multiseries* (Buenadicha, 2006). Aunque se ha informado que este organismo es dominante a temperaturas más frías; sin embargo, es capaz de sobrevivir hasta 30° C, aunque su rango óptimo está entre las temperaturas de 15 – 20° C (FAO, 2005). Sin embargo, se ha observado floraciones mono – específicas de *P. pungens* f. *multiseries* a fines de otoño o en invierno, con bajas temperaturas prevalentes del agua (-1 a 3<sup>o</sup> C). Como la temperatura óptima de crecimiento es muy superior a ésta, es evidente que otros factores han de haber iniciado el desarrollo de las floraciones (FAO, 2005).

**c. Distribución**

*Pseudo-nitzschia* son diatomeas ampliamente distribuidas y según los estudios realizados por Hasle & Fryxell (1995 in FAO, 2005) es la siguiente:

*P. multiseriata*:

Atlántico: aguas de Canadá, USA, México, Europa, África y Sur América (Argentina).

Pacífico: aguas de California, aguas costeras de Penn Cove, Washington (USA), nordeste de Asia, Japón y Gran Bretaña.

*P. australis*

Atlántico: aguas costeras de España, Portugal, África del Suroeste y Argentina.

Pacífico: aguas costeras de Perú, Chile, Nueva Zelanda, México (Golfo de California), costa oeste de América del Norte, desde San Diego (California) a Puget Sound, Washington, Columbia Británica.

*P. delicatissima*

Atlántico: aguas costeras de Noruega, aguas danesas, Skagerrak, África del noroeste, Rhode Island y Argentina y aguas costeras de USA.

Pacífico: California.

*P. pungens*

Atlántico: aguas costeras de Argentina y aguas costeras de USA (Louisiana).

Pacífico: aguas costeras de USA (Penn Cove, Washington)

México (Golfo de California) Aguas costeras de Nueva Zelanda.

*P. seriata*

Mar de Barents, Mar Noruego, Mar del Norte, aguas costeras noruegas, Skagerrak, bahía de Kiel, Canal de la Mancha, Groenlandia hasta Terranova, Alaska, Islas Británicas y las aguas costeras de Argentina.

**d. Impactos causados en la maricultura**

Los impactos causados en la maricultura se presentan en diferentes partes del mundo, registrándose las más importantes en la tabla 6.

**Tabla 8. Impactos de las toxinas ASP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la maricultura.**

PAISES	AÑOS	ORGANISMOS EN CULTIVO	CONSECUENCIAS
Irlanda	2002	Almejas	Niveles altos de toxinas en los organismos.
España	1995 2000 - 2002	Almejas Moluscos	Prohibición de las cosechas en algunas zonas de cultivo. Cierre de las zonas de producción.
Chile	1997 - 2001	Moluscos	Incremento sostenido de toxinas en los moluscos sin casos de intoxicación.

Adaptado de FAO (2005).

**e. Toxicidad de las toxinas ASP**

Se conoce el mecanismo de acción del DA en receptores de amino ácidos excitables y en la transmisión sináptica. Los amino ácidos excitables son el L-glutamato y L-aspartato, estos son considerados desde hace tiempo como los neurotransmisores más probables en las células. Se sabe que actúan sobre varios tipos de receptores y los mejor caracterizados reciben los nombres de los estimulantes exógenos selectivos como el Nmetil-D-aspartato (NMDA), cainato y quisqualato (Ardilla, 2001; Correa, 2006; Suárez, 2004).

El DA es un análogo de glutamato que se une con alta afinidad a los receptores glutamato en las células. El glutamato y una subclase de NMDA abren los canales de membrana permeables al Na<sup>+</sup>, resultando en la entrada del Na<sup>+</sup> y la despolarización de la membrana. Los canales abiertos por el receptor NMDA accesible al cainato, quisqualato y al DA, son altamente permeable al Ca<sup>2+</sup> e inducen la entrada del Ca<sup>2+</sup> a la célula, causándole efectos letales (Suárez, 2004). La acción sobre los receptores NMDA pueden antagonizarse selectivamente mediante concentraciones micromoleculares de iones magnesio y por medio de antagonistas orgánicos como el D-2-amino-5-fosfonovalerato (APV) y anestésicos disociativos, como la fenciclidina (Ardilla, 2001; FAO, 2005).

El ácido cinurénico, administrado intraperitonealmente a ratones, resultó un protector poderoso y significativo contra la neurotoxicidad inducida con extractos de mejillón contaminados con ASP (FAO, 2005). Se ha considerado su uso como antídoto, para la intoxicación

con domoato, de posibles drogas que bloqueen el receptor sensible al domoato. El DA es un neuroexcitante dos a tres veces más potente que el ácido cainico, con el que está estructuralmente relacionado y es hasta 100 veces más potente que el ácido glutámico. Es posible un efecto sinérgico entre el DA y otros aminoácidos neurotóxicos habitualmente presentes en los mejillones (Correa, 2006).

El DA tiene dos blancos primarios en el sistema nervioso central, la formación hipocampal y sus regiones asociadas involucradas en los procesos de la memoria y la región peduncular del área postrema y núcleo del tracto solitario asociado con la función visceral (FAO, 2005).

#### **4.2. TOXINA DIARREICA DE MOLUSCO (DSP: “DIARRHETIC SHELLFISH POISONING”)**

La Intoxicación Diarreica por Mariscos (DSP) se da por compuestos liposolubles que se acumulan en los tejidos adiposos de los bivalvos, como mejillones, vieiras, ostras y almejas. La ingestión de estos mariscos contaminados por acumulación de toxinas causa la intoxicación en el ser humano, cuyos síntomas incluyen diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Los síntomas aparecen entre 30 minutos y algunas horas luego de la ingestión, siendo la recuperación completa dentro de los tres días siguientes (Buenadicha, 2006).

Las toxinas DSP según Suárez (2004), se clasifican según su estructura química en tres grupos; el primer grupo incluye las toxinas ácidas e

incluye el ácido okadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (DTX); el segundo grupo incluye las toxinas neutras y compuestos tipo poliéter lactona del grupo de las pectenotoxinas (PTX); y el tercero incluye los poliéteres sulfatados y sus derivados, las yesotoxinas (YTX).

Los productores de toxinas DSP son, generalmente, los dinoflagelados del género *Dinophysis*, aunque también se determinó que el género *Prorocentrum* también produce toxinas DSP. La producción de toxinas DSP varía considerablemente según la especie de dinoflagelado (fig. 3) y los morfotipos estacionales y regionales dentro de una misma especie. También se observó que la cantidad de células de dinoflagelado por litro, necesaria para contaminar los mariscos es variable. Las áreas más afectadas parecen ser Europa y Japón, aunque, se observa una tendencia creciente en la incidencia de las DSP, o al menos en la presencia de toxinas DSP, ya que con frecuencia se informa de algas productoras de toxinas DSP y de bivalvos tóxicos en zonas nuevas (FAO, 2005).

Según el Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo no se consideran aptos para el consumo humano los mariscos que contienen, las dinofisistoxinas y las pectenotoxinas, en más de 160 mg, con relación al equivalentes de AO por Kg (el cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado) o 1 mg de equivalente de yesotoxina por Kg.

#### **a. Estructura química y propiedades**

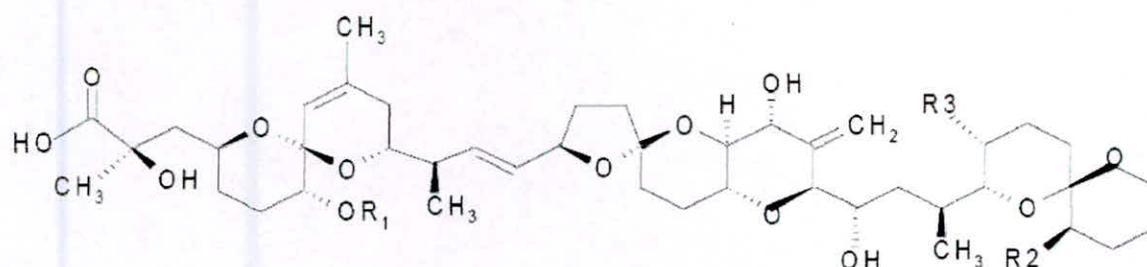
Todas las toxinas DSP son poliéteres termoestables lipófilos, aisladas de distintas especies de mariscos y de dinoflagelados. Si

bien la diarrea es el síntoma de intoxicación más característico, existen muchos otros que parecen importantes ya que algunas de las toxinas del complejo DSP (por ejemplo, las PTX e YTX) no producen tipo alguno de diarrea (FAO, 2005). Estudios realizados por Quilliam (2003), mencionan que en una segunda evaluación de su toxicidad estos dos últimos estarían eliminados del grupo de las toxinas DSP. Los distintos tipos químicos de toxinas asociados al síndrome DSP incluyen:

1) El primer grupo de toxinas ácidas, formado por varios compuestos lipófilos que se acumulan en el tejido adiposo de los mariscos: el ácido okadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas las toxinas DTX1, DTX2 y DTX3 (fig. 7). Estos compuestos son potentes inhibidores de la fosfatasa, relacionada con la inflamación del tracto intestinal y la diarrea en los seres humanos; ensayos en el laboratorio con animales indican que el AO y la DTX1 son también tumorigénicos (FAO, 2005).

La DTX1 se detectó por primera vez en Japón, en la especie *Dinophysis fortii*, y la DTX2 se identificó en mariscos de Irlanda durante un episodio de DSP. La DTX2 también se aisló a partir de la biomasa del fitoplancton marino, formado principalmente por *Dinophysis acuta* (James *et al.*, 1999). De extracto de mejillones irlandeses se aisló e identificó un nuevo isómero de la DTX2, denominado DTX2B. En un principio, la denominación DTX3 describía a un grupo de derivados de las toxinas DSP en los que el grupo 7-OH de la DTX1 estaba unido a grupos de ácidos grasos

saturados o insaturados, sin embargo, recientemente se determinó que cualquiera de las toxinas progenitoras, es decir el AO, la DTX1 y la DTX2, pueden estar unidas con una serie de ácidos grasos, saturados e insaturados, desde el C14 al C18 (FAO, 2005; Wright, 1995).

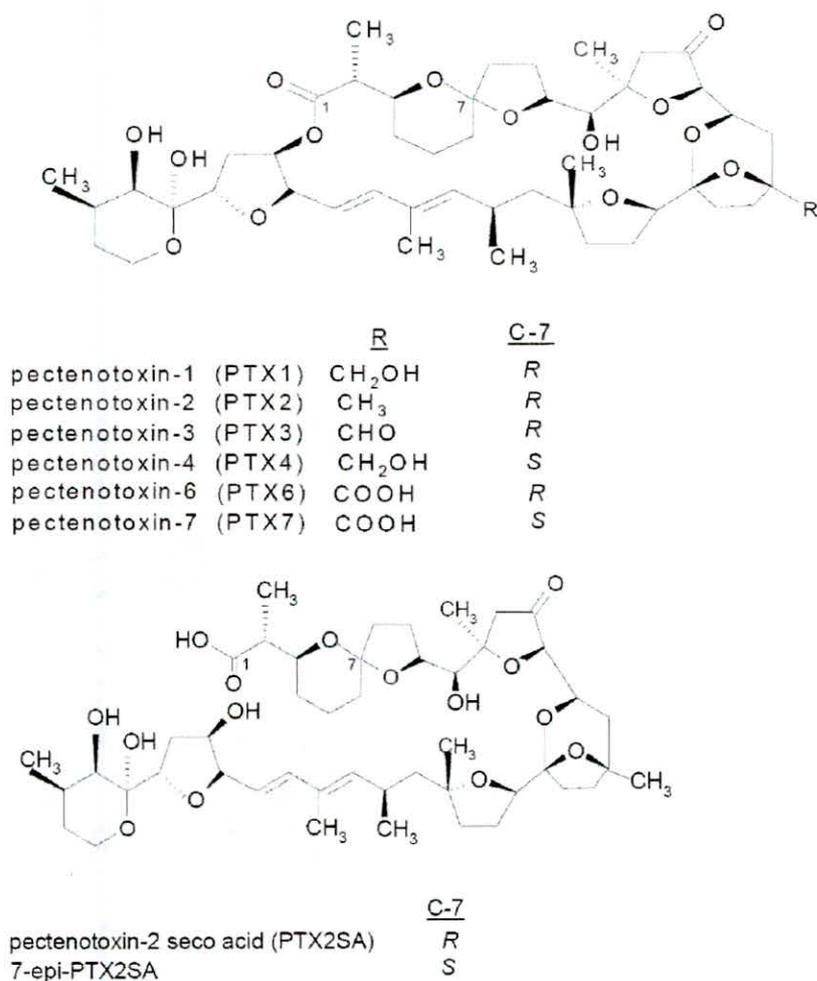


	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	H	CH <sub>3</sub>
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH <sub>3</sub>	H
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Tomado de FAO (2005).

**Fig. 7. Estructura química del ácido okadaico, y el de las dinofisistoxinas.**

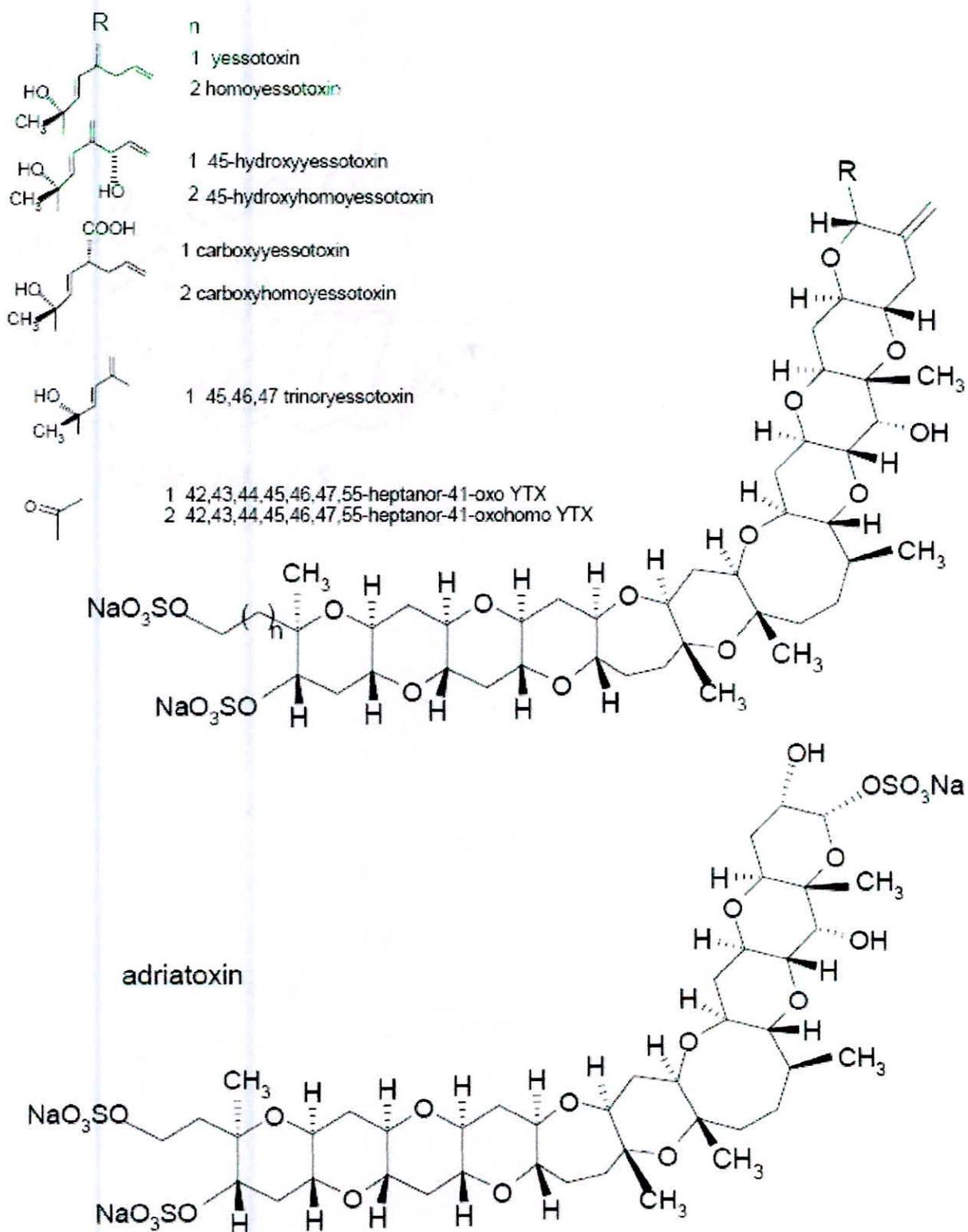
2) El segundo grupo de toxinas las neutras, está compuesto por lactonas poliéter del grupo de las pectenotoxinas (toxinas PTX). A la fecha se han aislado diez toxinas PTX y seis de ellas las PTX1, -2, -3, -4, -6 y -7 (fig. 8), se han identificado químicamente. La PTX2 (PTX2, CH<sub>3</sub>) solo se ha detectado en la microalga *Dinophysis fortii*, que se le encuentra en Japón y Europa. Estas pectenotoxinas nunca se han encontrado en los mariscos, por lo que se cree que se oxidan en el hepatopáncreas de los mariscos y produce otras toxinas PTX como las PTX1 – CH<sub>2</sub>OH; PTX3 – CHO; PTX6 – COOH (Correa, 2006; Suárez, 2004).



Tomado de FAO (2005).

**Fig. 8. Estructura química de las pectenotoxinas.**

3) El tercer grupo comprende un compuesto sulfatado denominado yesotoxina (YTX), un poliéter tipo brevetoxina y su derivado la 45 – hidroxiesotoxina 45-OH-YTX (fig. 9). La yesotoxina se aisló por primera vez en Japón, a partir de los órganos digestivos de vieiras, *Patinopecten yessoensis* y se cree que es producida por las microalgas. La yesotoxina no causa diarrea. En ratones se observó que una administración intraperitoneal de yesotoxina afecta el músculo cardíaco, mientras que la yesotoxina desulfatada daña el hígado (Correa, 2006; Suárez, 2004).



Tomado de FAO (2005).

Fig. 9. Estructura química de las yessotoxinas y de la adriatoxina.

Trabajos realizados por Satake *et al.* (1999 *in* FAO, 2005) produjeron el aislamiento de las YTX 45, 46, 47- trinoryesotoxina a partir de células de cultivo de *Protoceratium reticulatum*, observándose que la producción de yesotoxinas en esta especie difiere según la cepa. Ciminiello *et al.* (1998 *in* FAO, 2005) descubrió otro análogo nuevo de la YTX, la adriatoxina (ATX), encontrándola en la glándula digestiva de mejillones del mediterráneo infectados con DSP y recolectados en las costas italianas.

4) Una toxina nueva (C47H71NO12), denominada provisoriamente toxina-3 Killary o KT3 se aisló luego de una intoxicación no explicada en seres humanos, con síntomas tipo DSP, ocurrida en Irlanda en 1995 al ingerir mejillones de Killary. Esta toxina se denominó azaspiracida (FAO, 2005).

**b. Organismos y condiciones favorables**

Los productores de toxinas DSP son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*. En condiciones ambientales favorables, estas algas pueden reproducirse rápidamente y causar floraciones.

Viviani (1992), hace mención a siete especies de *Dinophysis* que producen las toxinas DSP, *D. fortii* (en Japón), *D. acuminata* (Europa), *D. acuta*, *D. norvegica* (Escandinava), *D. mitra*, *D. rotundata* y *D. tripos*, y los dinoflagelados bentónicos *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum* (o *P. maculosum*) y *Prorocentrum redfieldi* (Chile, Australia y Nueva Zelanda). Estudios realizados por Hallegraef & Hara (1995) indican que se sospecha de otras tres

especies de *Dinophysis*, *D. caudata*, *D. hastata* y *D. sacculus* que también producen las toxinas DSP. Las máximas concentraciones de toxinas DSP se encontraron en floraciones ocurridas a principios de primavera; los autores indican que, si bien la toxicidad de *D. sacculus* es baja, la participación de la especie en los eventos nocivos en el Mediterráneo está lejos de ser despreciable.

La producción de toxinas varía considerablemente según la especie y según los morfotipos regionales y estacionales de una misma especie, por ejemplo en el norte de Japón, *D. fortii* contiene altas concentraciones de toxinas en marzo y junio, hecho asociado a una importante acumulación de toxinas en mariscos (FAO, 2005).

Las condiciones propicias para el desarrollo de los dinoflagelados son la ausencia de diatomeas, aguas ricas en nitratos, con baja presencia de silicatos y una temperatura entre 20 – 23° C (Correa, 2006).

### c. **Distribución**

La incidencia de DSP, presenta una tendencia creciente, lo que puede atribuirse en parte, a un mejor conocimiento de la enfermedad y a los programas de vigilancia que son más eficaces en la actualidad, registrándose con mayor frecuencia la presencia de microalgas productoras de toxinas y moluscos contaminados con toxinas en diferentes zonas del mundo (Buenadicha, 2006). La distribución conocida de las DSP incluye Japón, Europa, Chile,

Tailandia, Canadá (Nueva Escocia) y probablemente Tasmania (Australia) y Nueva Zelanda (Hallegraeff & Hara, 1995).

Los mariscos acumulan toxinas en cantidades suficientes como para afectar al ser humano con tan sólo 200 células de *Dinophysis* por litro. Se ha observado que en aguas holandesas del Mar de Wadden, solo se asociaron con DSP las floraciones que cuentan con más de 20 000 cél. l<sup>-1</sup> (FAO, 2005).

En aguas del Atlántico, en Europa, se observaron otras especies de dinoflagelados: *D. acuminata* y *D. acuta* en España, *D. acuminata*, *D. sacculus* y *P. lima* en Francia; *D. acuminata*, *P. redfieldii* y *P. micans* en los países bajos *D. acuta*, *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. caudata* y *P. lima* en Portugal, *D. acuta*, *D. acuminata*, *P. lima* y *P. concavum* en Irlanda; *D. acuta*, *D. acuminata*, *D. norvegica*, *P. micans*, *P. minimum* y *P. lima* en Escandinavia; *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. tripos*, *D. caudata* y *D. fortii* en el Mar Adriático (FAO, 2005)

#### **d. Impactos causados en la maricultura**

Los impactos causados en la maricultura por las toxinas DSP, son muchos y se dan en diferentes partes del mundo, registrándose las más importantes en la tabla 7.

**Tabla 9. Impactos de las toxinas DSP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la maricultura y salud humana.**

PAISES	AÑOS	ORGANISMOS EN CULTIVO	CONSECUENCIAS
Bélgica	1994	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	No se registraron problemas de salud.
Dinamarca	1990	Mejillones	Intoxicación de 415 personas en Francia.
	1999	Mejillones	Cierre de zonas por algunas semanas.
	2001	Mejillones	Concentraciones altas de toxinas en organismos para ventas.
	2002	Mejillones	Cierre de varias zonas por mucho tiempo.
Francia	1984 – 1985	Mejillones	Intoxicación de 12000 personas.
	1998	Almejas, ostras y mejillones	Cierre de áreas por espacio de 2 meses.
	2000	Almejas, ostras y mejillones	Cierre de varias zonas de cultivo.
	2002	Mariscos	Cierre de zonas por 4 meses.
Grecia	2000	Moluscos	Cierre de zonas por 3 meses.
Irlanda	1994	Mejillones	Observación de las zonas de cultivo.
Italia	2001	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cierre de varias zonas de cultivo por espacio de 3 meses.
Brasil	1990	Mejillones	Trastornos gastrointestinales y diarrea en varias personas.
Chile	1991	Mejillones	Intoxicación de 120 personas.

Adaptado de FAO (2005).

**e. Toxicidad de las toxinas DSP**

La primera clave para elucidar el mecanismo de acción de las toxinas DSP fue descubrir que el AO provoca una contracción de larga duración del músculo liso de las arterias humanas. Una subunidad de la miosina activa la contracción del músculo liso, por lo que se asumió que el efecto del AO se debía a la inhibición de la fosfatasa de la miosina de cadena pequeña. Con posterioridad, se demostró que el AO es un potente inhibidor de las fosfatasas PP1 y PP2A serina / treonina y que la inhibición de la PP2A es aproximadamente 200 veces superior a la de la PP1 (Correa, 2006).

Las fosfatasas proteicas son un grupo de enzimas muy importantes y estrechamente relacionadas con muchos procesos metabólicos esenciales de la célula. La fosforilación y la desfosforilación de las proteínas son uno de los principales procesos de regulación en las células eucariotas. Estos procesos versátiles regulan entre otros el metabolismo, el transporte y la secreción en la membrana, la contractilidad y la división celular (Suárez, 2004).

Suárez (2004), indica que las fosfatasas que participan en el inicio de la mitosis, son sensibles al AO, así como también al PP1 y PP2A. Según Hallegraeff & Hara (1995), la causa de la diarrea en el ser humano es la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción del sodio de las células intestinales o un aumento de la fosforilación de las proteínas citoesqueléticas o de unión, responsables de regular la permeabilidad a los solutos, lo que ocasiona una pérdida pasiva de fluidos.

El estudio exhaustivo de la actividad y de la estructura del AO en la inhibición de la actividad de las fosfatasa proteicas indican que un grupo carboxilo libre de la molécula DSP es esencial para la actividad ya que los ésteres diólicos y metílicos no inhiben la fosfatasa. Sin embargo, la actividad de los derivados de la amida y del carboxil reducido (ocadaol) es la mitad que la del AO, al igual que la de los compuestos DTX3 naturales (FAO, 2005).

#### **4.3. TOXINA PARALIZANTE DE MOLUSCO (PSP: “PARALITIC SHELLFISH POISONING”)**

Las toxinas parálíticas (PSP) son compuestos que se acumulan en los mariscos que ingieren algas productoras de estas toxinas. La ingestión de estos mariscos contaminados por acumulación de toxinas causa en el ser humano, la intoxicación parálítica por mariscos. Los síntomas de PSP pueden presentarse como un entumecimiento o picazón leve hasta la parálisis respiratoria completa, que en casos fatales, ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión (Buenadicha, 2006; Correa, 2006).

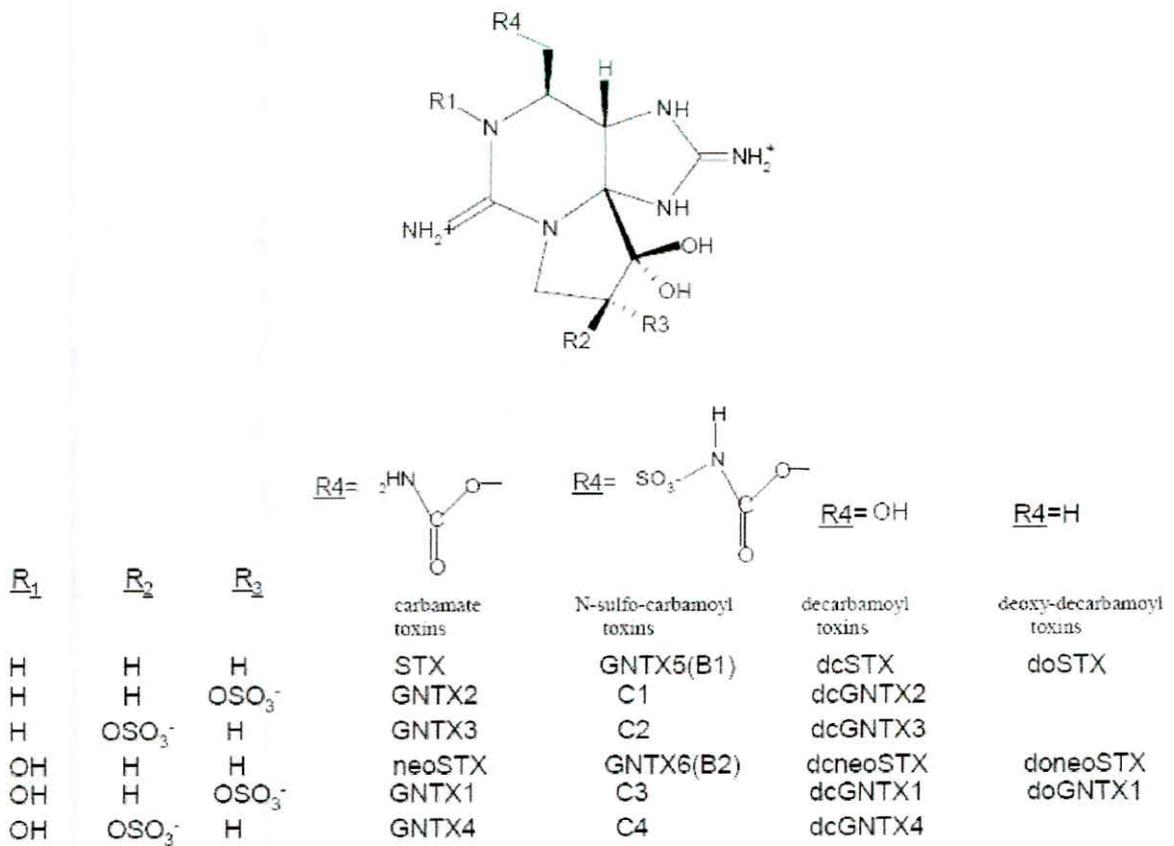
Las toxinas PSP son un grupo de 21 tetrahidropurinas estrechamente relacionadas cuya toxicidad difiere ampliamente entre ellas, siendo la más tóxica la saxitoxina (STX), la primera toxina PSP caracterizada químicamente (Correa, 2006). Los dinoflagelados del género *Alexandrium* de zonas de clima tropical o templado son los principales responsables de la producción de estas toxinas. Los mariscos que se alimentan de estos

dinoflagelados acumulan las toxinas, sin sufrir los efectos nocivos de las toxinas ya que son bastante resistentes (Buenadicha, 2006; FAO, 2005).

En los últimos 20 años se ha registrado un aumento aparente de las intoxicaciones causadas por PSP, sin embargo aún no se sabe si el aumento es real, o se dio a consecuencia de los progresos en la identificación, detección y de registros médicos, o si se debe a una expansión del cultivo y del consumo de mariscos, pero más de una veintena de países cuentan con reglamentación específica para esta toxina (FAO, 2005).

#### **a. Estructura química y propiedades**

Las toxinas PSP son termoestables en pH ácido (salvo los componentes del N-sulfo-carbamoil), pero inestables en condiciones alcalinas, oxidándose fácilmente. Son muy solubles en agua y metanol, y prácticamente insoluble en disolventes lipídicos (Suárez & Guzmán ??). Las toxinas están constituidas por un grupo compuesto de tetrahidropurina estrechamente relacionados, dividido en cuatro subgrupos: a) carbamato (STX, neoSTX) y las gonyautoxinas (GNTX1 – 4); b) N-sulfo-carbamoil (GNTX5-6, C1-4); c) decarbamoil (dcSTX, dcneoSTX, dcGNTX1-4); y d) compuestos de desoxidecarbamoil (doSTX, doneoSTX y doGNTX1). Se han identificado al menos 21 toxinas PSP (fig. 10), principalmente a partir de dinoflagelados y de mariscos que se alimentan de las microalgas tóxicas (Correa, 2006; FAO, 2005).



Tomado de FAO (2005).

Fig. 10. Estructuras químicas de las toxinas PSP.

Las toxinas se presentan como mezclas de compuestos con distintas capacidades de ionización, lo que dificulta su aislamiento (Correa, 2006). La cromatografía de intercambio iónico, junto con el bioensayo en ratón, permitieron aislar una toxina hidrosoluble básica a partir de la "almeja amarilla" *Saxidomus giganteus*, denominada, con el transcurso del tiempo saxitoxina (STX). El primer derivado cristalino de la STX se sintetizó y caracterizó químicamente en 1975 (Ardilla, 2001).

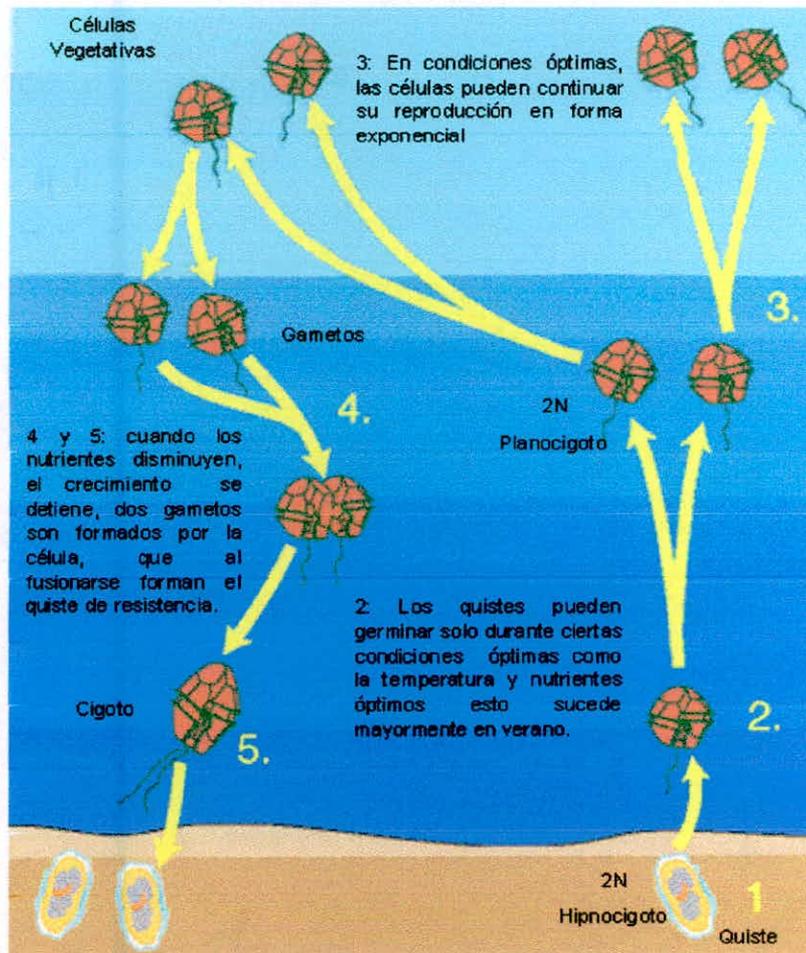
La actividad tóxica reside en el grupo cetona hidratado o dihidroxi del anillo heterocíclico de cinco miembros, actividad que desaparece cuando estos grupos se transforman en monohidroxi por reducción

catalítica con hidrógeno. La sustitución de la cadena secundaria con el grupo carbamoilo en el anillo heterocíclico de seis miembros por un grupo hidroxilo resulta en una molécula con aproximadamente el 60 por ciento de la actividad tóxica original. Este grupo hidroxilo activo permite preparar distintos derivados de la STX (FAO, 2005).

**b. Organismos y condiciones favorables**

Los productores de toxinas PSP son dinoflagelados del género *Alexandrium* (conocido como *Gonyaulax* o *Protogonyaulax*), en concreto: *Alexandrium tamarensis*, *A. minutum* (sinónimo: *A. excavata*), *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. fundyense* y *A. cohorticula*. La STX se acumula en los tejidos de mariscos (almejas, mejillones, ostras, berberechos, vieiras, langosta, gasterópodos) cuya fuente mayoritaria de alimento está constituida por estas microalgas. La toxina no parece afectar a los mariscos, pero resulta altamente tóxica en humanos, incluso en pequeñas cantidades (FAO, 2005).

La toxicidad de las toxinas de los dinoflagelados varía según la mezcla de derivados de STX, cuya composición difiere según la especie que los produce y/o la región en que se presentan. Algunos dinoflagelados como *A. excavata* poseen, además de su forma móvil, un quiste de resistencia (fig. 11). Estos se depositan en el sedimento del fondo del mar, donde hibernan. Ciertas condiciones climáticas y medioambientales favorables explicadas con anterioridad son las que promueven la germinación de los quistes, que pasan a estado libre, llegando a reproducirse con gran rapidez, desencadenando las floraciones (FAO, 2005).



Adaptado de Chávez *et al.* (2005).

**Fig. 11.** Esquema simplificado del ciclo de vida de los dinoflagelados con su quiste de resistencia.

Los quistes son también tóxicos, aunque su toxicidad no se ha determinado con exactitud, algunos estudios indican que es similar a la del dinoflagelado, mientras que otros sostienen que las concentraciones de toxinas PSP en los quistes son entre 10 y 1000 veces superiores a las de las células móviles (Fernández *et al.*, 1995).

El Niño es un evento causado por un desequilibrio de la presión atmosférica y de las temperaturas del este y del oeste del Océano Pacífico, que provoca una disminución de la profundidad de la capa de termoclina, promoviendo la germinación de quistes en Suramérica (Buschmann, 2005). Se encontraron pruebas de la coincidencia de floraciones de *Pyrodinium* y los cambios climáticos ocasionados por el Fenómeno de Oscilación Austral del Niño (ENSO) (FAO, 2005).

Estudios realizados por Siu (*in* Suárez & Guzmán, ??), indican que una disminución del nitrógeno limita el crecimiento de la población y la producción de toxinas, mientras que una disminución del fósforo limita solamente el crecimiento de la población y fomenta la producción de toxinas. En la especie *Alexandrium catenella*, los nutrientes no constituyen un factor limitante, los principales factores limitantes son: la temperatura (entre 20 – 25° C), la salinidad (entre 30 – 35 ppm) y el pH (entre 8,0 a 8,5).

Los moluscos bivalvos se alimentan por filtración de las células y quistes de dinoflagelados, los cuales pasan al estómago y esófago. Durante la digestión en el estómago y divertículos, se liberan las toxinas y entran en los órganos digestivos. La concentración y composición de toxinas acumuladas en los tejidos varía con la especie de marisco, o del dinoflagelado, o por las condiciones medioambientales y evolución en el tiempo. Así, los mejillones acumulan casi la totalidad de las toxinas en las vísceras, las vieiras retienen toxinas en glándulas digestivas, gónadas y branquias; en

las almejas amarillas la STX se une químicamente al tejido del sifón, donde puede permanecer durante años. Tras su absorción y distribución, las toxinas sufren una serie de transformaciones, como la posible biosíntesis de STX a partir de GNTX 1-4 y/o neoSTX (FAO, 2005). Una transformación común es la epimerización, como el intercambio de los grupos H y OSO<sub>3</sub> - en la posición 11 de la molécula de STX en mejillones y vieiras que disminuye la toxicidad once veces. La hidrólisis ácida causa la separación del grupo SO<sub>3</sub> - de la posición 21 de la molécula de STX, lo que por el contrario, aumenta la toxicidad seis veces (Ardilla, 2001; FAO, 2005).

**c. Distribución**

Los dinoflagelados y sus quistes se han encontrado principalmente en aguas próximas a América del Norte, Europa y Japón, aunque se registra su presencia creciente en Asia (FAO, 2005).

**d. Impactos causados en la maricultura**

Los impactos causados en la maricultura y en los humanos son muy considerables y se encuentran en diferentes partes del mundo como se registra en la tabla 8.

**Tabla 10. Impactos de las toxinas PSP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la maricultura y salud humana.**

PAISES	AÑOS	ORGANISMOS EN CULTIVO	CONSECUENCIAS
África	2001	Abalones ( <i>Haliotis mida</i> )	Depuración de los organismos por mucho tiempo.
Alemania	1996	<i>Crassostrea gigas</i>	Presencia de GNTx2 y GNTx3 en los organismos.
Canadá	1999	Vieiras	Intoxicación de 2 personas.
China	2000 – 2005	Mariscos	Presencia de 40 – 50 mareas rojas por año, muy pocos efectos en la salud humana por la buena documentación de las mareas en sus aguas de cultivo.
USA	1980	Mejillones y ostras	Intoxicación de 51 personas.
España	1976	<i>Mytilus edulis</i>	Intoxicación de 120 personas en Alemania, Francia, Suiza e Italia.
	1995 – 1997	Bivalvos	Prohibición de cosechas de los bivalvos.
	2002	<i>Acanthocardia tuberculata</i> y vieiras	Cierre de zonas de cultivo.
Filipinas	1989 - 1998	Mejillones	Mortalidad de 116 personas.
Francia	1992	Mejillones	Cierre de áreas de cultivo.
	1998	Almejas y ostras	Cierre de áreas de cultivo por 2 meses.
Inglaterra	2000 – 2001	Mejillones	Retención de la cosecha en las zonas y su respectiva depuración.
	2002 – 2003	Mejillones	Retención de la cosecha y monitoreo de las áreas de cultivo.
Japón	1992	Vieiras, ostras y mejillones	Organismos contaminados con toxinas.
	1999 – 2001	Ostras.	Monitoreo de las áreas de cultivo.
Malasia	1991	Mejillones	Intoxicaciones humanas.
México	1993 – 1994	<i>Argopecten circularis</i>	Cierre de cosecha en las zonas de cultivo.
Portugal	1994	<i>Mytilus edulis</i>	Intoxicación de 9 personas.

Suecia	1986 – 1988	<i>Acanthocardia excavatum</i>	Cierre de las zonas de cultivo.
Túnez	1998	Róbalos y Bejugos	Mortalidad de 700 TM de organismos de cultivo.

Adaptado de FAO (2005).

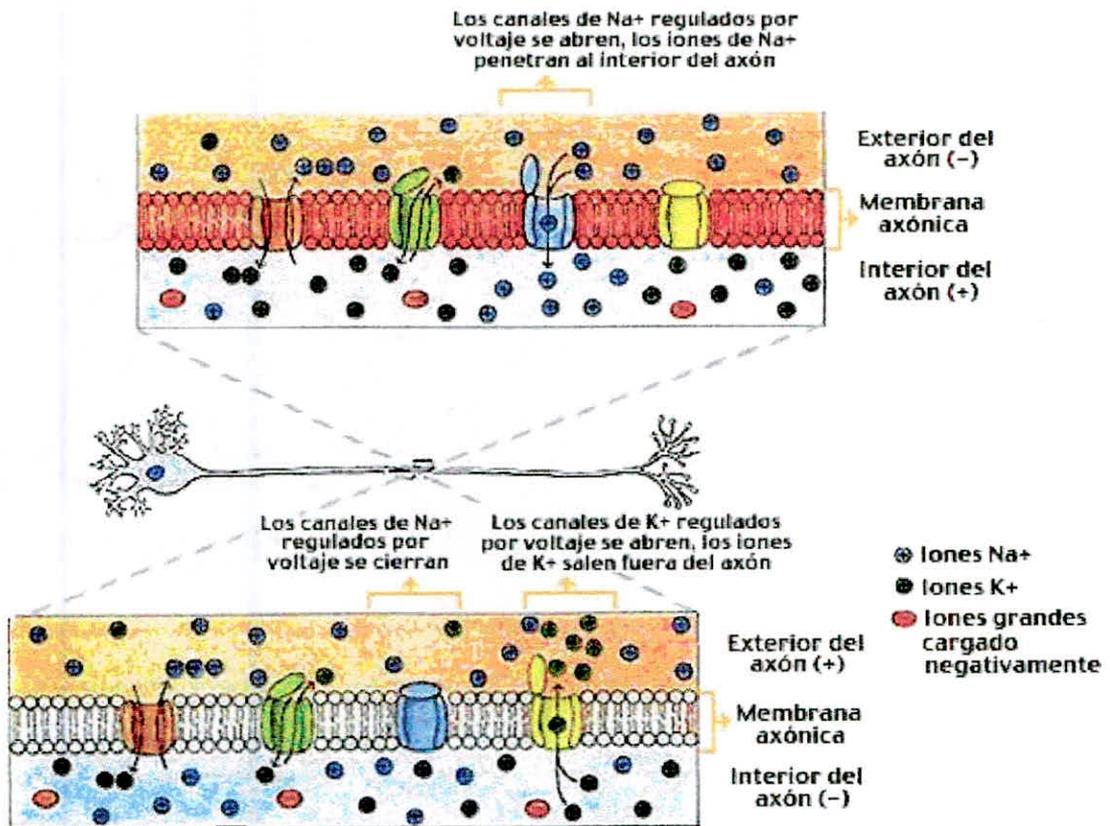
#### e. Toxicidad de las toxinas PSP

La acción farmacológica de las toxinas PSP es muy similar a la de las tetradotoxinas (TTX). Como los mecanismos de acción de la STX y de la TTX son casi idénticos se asumió que ambas moléculas tenían la misma interacción con el receptor en la bomba de sodio dependiente de voltaje (Suárez, 2004). El canal de sodio voltaje dependiente es una proteína de aproximadamente 250000 Da, que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables. Está caracterizada por una conducción uniforme, que depende del potencial y presenta selectividad iónica. Esta proteína se encuentra en los nervios de los mamíferos, en las fibras del músculo esquelético y en la mayoría de las fibras del músculo cardiaco (Vendrell, 2006).

Una vez que la célula se despolarizó correctamente, la conformación de la molécula del canal de sodio cambia (fig. 12A). Se abre un camino acuoso que permite el desplazamiento del ión Na<sup>+</sup> de la fase extracelular hacia el interior de la célula mediante ciertas fuerzas electroquímicas. El flujo de sodio hacia el interior causa un aumento de la fase del potencial de acción. Toda membrana celular, presentan canales de sodio dependientes del voltaje que, cuando se

abren, permiten el desplazamiento del  $K^+$  intracelular hacia fuera con la consecuente repolarización. (fig. 12B) (Aranibar & Sigueñas ??; Cunningham, 1995; Sandrine *et al.*, 2000; Vendrell, 2006).

### A. Potencial de acción



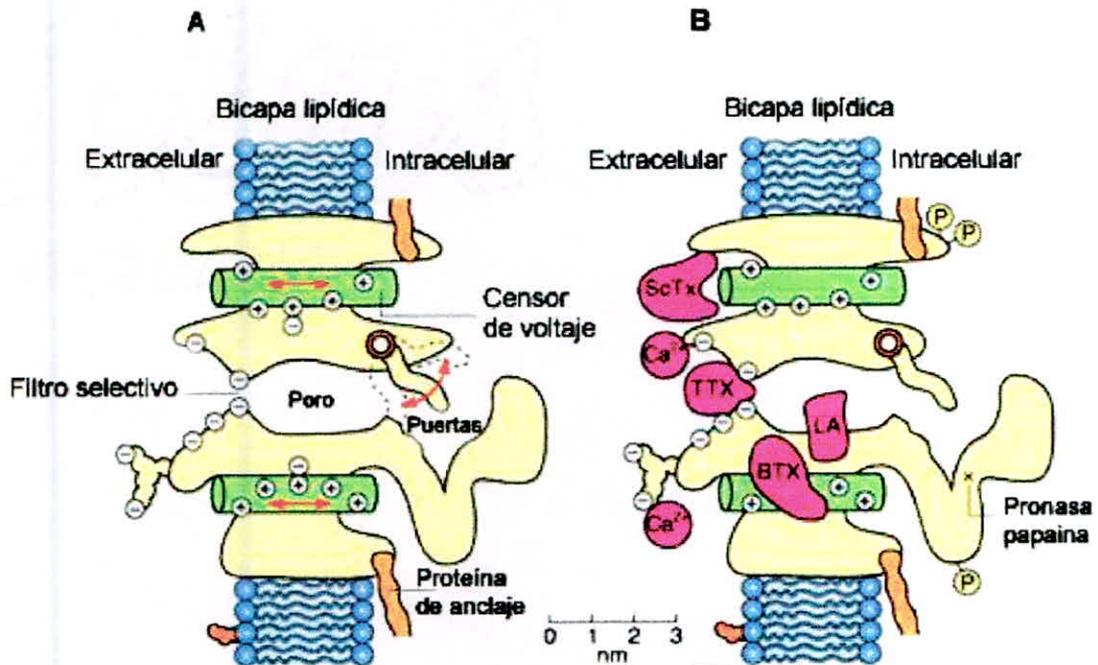
### B. Repolarización

Tomado de Aranibar & Sigueñas (??).

Fig. 12. Esquema que muestra A) los canales iónicos involucrados en la generación de un potencial de acción y B) la correspondiente repolarización en un axón.

El mecanismo por el cual se bloquea el canal de la bomba de sodio dependiente de voltaje (fig. 13A), ha sido objeto de varios estudios, pues las toxinas STX y la TTX, son los únicos agentes que lo bloquean selectivamente y con mucha afinidad (fig. 13B) (Suárez, 2004; Vendrell, 2006).

La STX y varias otras toxinas PSP bloquean el canal de sodio dependiente del voltaje con mucha potencia, disminuyendo o anulando la propagación del potencial de acción, pero sin afectar el canal de potasio (FAO, 2005; Vendrell, 2006).



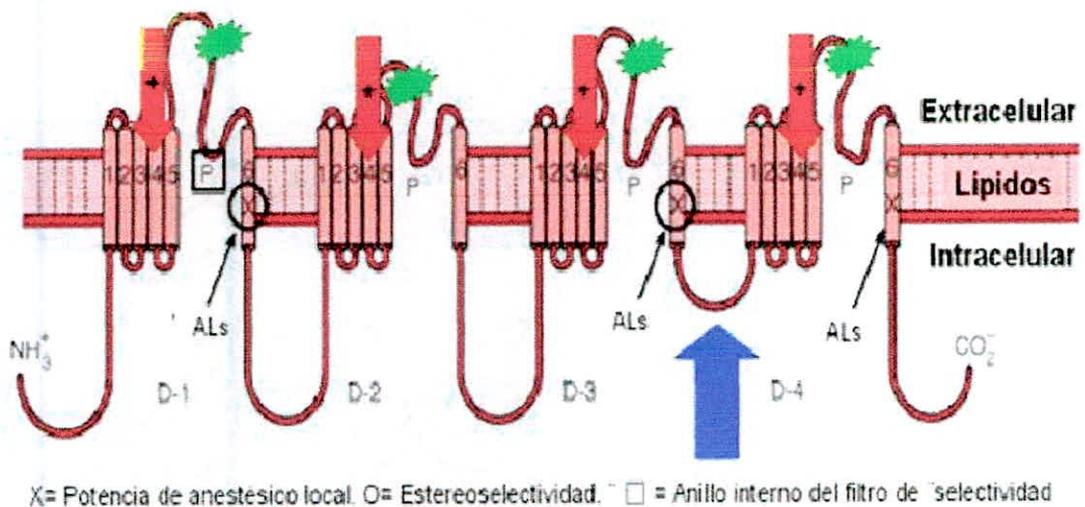
Tomado de Vendrell (2006).

**Fig. 13.** Diagrama funcional del canal de sodio voltaje dependiente (A) y de los hipotéticos sitios de unión a toxinas y fármacos (B): tetratoxinas (TTX); toxinas de anémonas (ScTx); batratoxinas, aconitina, veratridina y grayanotoxina (BTX); anestésicos locales (LA).

La STX y sus análogos, toxinas no proteicas hidrofílicas de bajo peso molecular (entre 280 y 450 Da) bloquean físicamente el poro e impiden la conducción de sodio. La STX y TTX, que constituyen los ejemplos clásicos de proteínas bloqueantes de poro, interaccionan con el receptor de las neurotoxinas de los canales de sodio en el sitio 1 (fig. 14), por la cara extracelular de la membrana. El sitio de unión del receptor TTX/STX está formado por dos anillos de residuos

de aminoácidos en el segmento SS2 del extremo N-terminal del segmento transmembrana S6 en cada uno de los cuatro dominios (D) del canal de sodio, cada dominio contiene 6 hélices que atraviesan la membrana celular. Las estrellas verdes localizadas entre los segmentos conectores 5 y 6 representan los sitios donde actúan las toxinas TTX. La compuerta de inactivación del canal de sodio está señalada por la flecha azul entre el dominio 3 y 4, sitio donde actúan los anestésicos locales (Correa, 2006; Whizar *et al.*, ??).

El tiempo promedio de bloqueo del canal depende de la velocidad de disociación y no de la concentración de toxinas. Sin embargo, la duración de la apertura del canal está relacionada reversiblemente con la concentración de toxinas y depende de la constante de asociación (FAO, 2005; Vendrell, 2006).



Tomado de Whizar *et al.* (??).

**Fig. 14.** Esquema de un canal de sodio, con sus cuatro dominios (D), cada dominio contiene 6 hélices que atraviesan la membrana celular.

#### 4.4. TOXINA NEUROTÓXICA DE MOLUSCO (NSP: “NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING”)

La intoxicación neurológica o neurotóxica por mariscos (NSP) es causada por brevetoxinas poliéteres producidas por un dinoflagelado sin blindaje, *Gymnodinium breve*, también llamado *Ptychodiscus breve* y desde el año 2000 llamado *Karenia brevis*. Las brevetoxinas son tóxicas para peces, mamíferos marinos, aves y seres humanos, aunque no para los mariscos (FAO, 2005).

Hasta el 1993, la intoxicación neurológica por mariscos era considerada endémica en el Golfo de México y la costa este de Florida, de donde se han informado de “mareas rojas” que datan desde la fecha de 1844. Una característica poco común de *Karenia brevis* es la formación, por acción de las olas, de aerosoles tóxicos que pueden resultar en síntomas similares al asma en los seres humanos (Lagos, 2002).

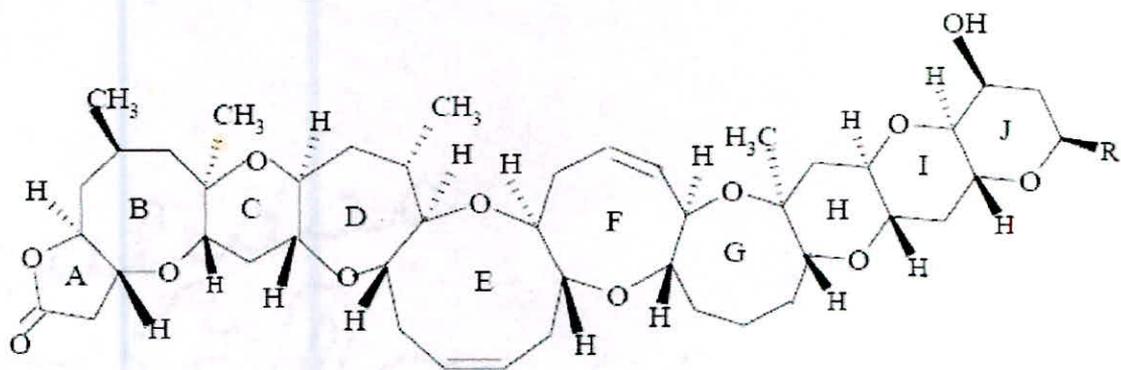
A comienzos de 1993, se informaron más de 180 intoxicaciones en seres humanos por mariscos desde Nueva Zelanda causadas por un organismo similar al *Gymnodinium breve*. Muy probablemente, este era un integrante de la flora oculta del plancton (presente previamente en bajas concentraciones), que se desarrolló convirtiéndose en una floración desencadenada por condiciones climáticas poco comunes (lluvias más abundantes y temperaturas inferiores a las habituales) coincidentes con el evento de “El Niño” (Hallegraeff & Hara, 1995).

**a. Estructura química y propiedades**

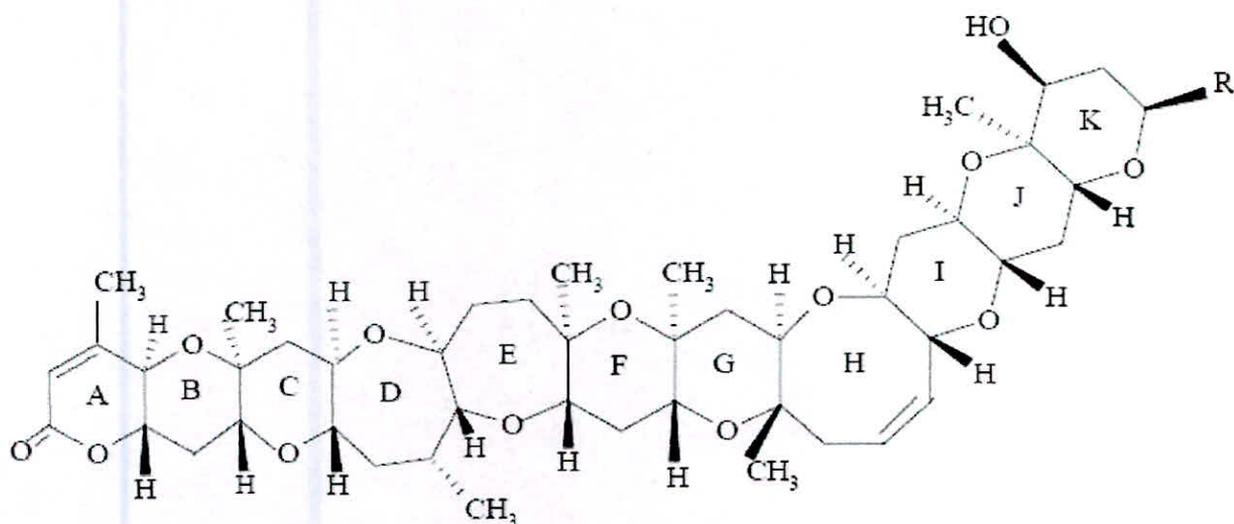
Las toxinas NSP, denominadas brevetoxinas, son neurotoxinas poliéter cíclicas insípidas, incoloras, estables al calor y a los ácidos, solubles en lípidos y producidas por el dinoflagelado marino *Karenia breve*. Estructuralmente las brevetoxinas son moléculas con anillos, con 10 a 11 anillos transfundidos y con pesos moleculares de alrededor de  $900 \text{ g mol}^{-1}$  (fig. 15). Se han aislado e identificado diez brevetoxinas en floraciones de campo y cultivos de *Karenia breve* (Nilsen, 1993).

Estas brevetoxinas muestran enlaces específicos en la posición 5 de canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje que conducen a su activación al potencial normal de reposo. Esta propiedad de las brevetoxinas es causante de los efectos tóxicos; la PbTx-2 (fig. 15), es la principal toxina aislada del *Karenia breve* (FAO, 2005).

De mariscos contaminados se aislaron cuatro análogos de las brevetoxinas (fig.16A y 16B) BTX-B1, BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 que pudieran ser metabolitos formados por el propio marisco, pues no se encontraron en las floraciones o en los cultivos de *Karenia breve* (Reguera, 2003).



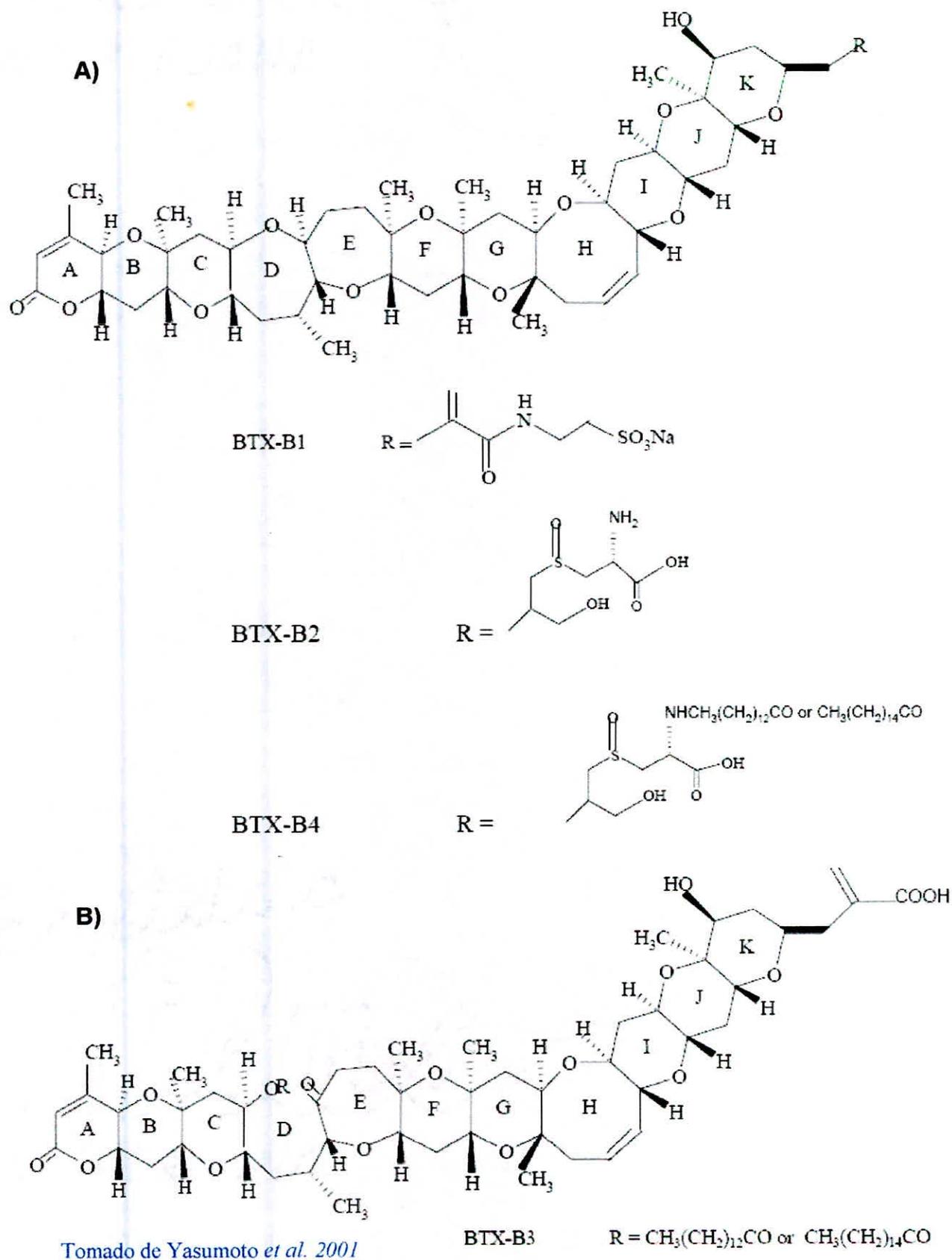
<b>Brevetoxinas Tipo 1 (A):</b>	PbTx-1,	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CHO}$
	PbTx-7,	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
	PbTx-10,	$R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$



<b>Brevetoxinas Tipo 1 (B):</b>	PbTx-2	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CHO}$
	oxidada PbTx-2	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{COOH}$
	PbTx-3	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
	PbTx-8	$R = \text{CH}_2\text{COCH}_2\text{Cl}$
	PbTx-9	$R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$
	PbTx-5	anillo-K acetato de PbTx-2
	PbTx-6	anillo-H epóxido de PbTx-2

Tomado de FAO (2005).

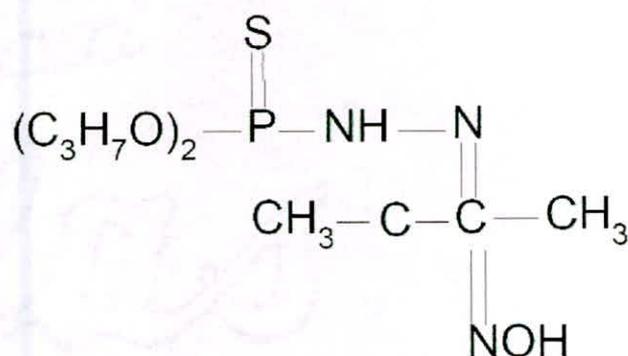
**Fig. 15.** Estructuras químicas de las brevetoxinas de tipo A y B.



**Fig. 16.** Estructuras químicas de los análogos de las brevetoxinas A) BTX-B1, BTX-B2 y BTX-B4 aisladas de mariscos contaminados; B) BTX-B3.

Si bien estos compuestos son solubles en disolventes orgánicos, son inestables en cloroformo, lo que ha dificultado su aislamiento. Tampoco presentan fluorescencia ni otras propiedades que faciliten su detección y cuantificación. Es por ello que no hay un método químico de análisis rápido y confiable (FAO, 2005; Reguera, 2003).

Reguera (2003) hace mención que además de las brevetoxinas ya existentes, se han logrado aislar de *Karenia breve* algunos compuestos ictiotóxicos fosforados, similares a las anticolinesterasas, como pueda ser la O,O-dipropil(E)-2-(1-metil-2-oxopropilideno) fosforohidrazidatoato-(E)oxima, compuesto acíclico fosforado con un grupo oximino y un grupo tiofosfato (fig. 17).



Tomado de FAO (2005).

Fig. 17. Toxina ictiotóxica fosforada aislada del *G. breve*.

## b. Organismos y condiciones favorables

La forma móvil de *Karenia breve* produce varias neurotoxinas, denominadas colectivamente brevetoxinas. Se han aislado e identificado diez brevetoxinas de floraciones de campo y de cultivos de *Karenia breve* (fig.15). Se consideraron como metabolitos formados de brevetoxinas en el marisco, a cuatro solamente análogos de brevetoxinas (fig. 16 A y B) aislados de mariscos contaminados y no de floraciones en el campo o cultivos de *Karenia breve* (FAO, 2005).

La microalga *Karenia breve* además de las brevetoxinas neurotóxicas también produce toxinas hemolíticas en menor cantidad que brevetoxinas. La mortandad masiva de peces observada durante las mareas rojas en las costas de Florida, se debe principalmente a exposiciones de brevetoxinas neurotóxicas con una posible contribución de la fracción hemolítica (Suárez & Guzmán, ??).

El organismo de *Karenia breve* es relativamente frágil, llegando a romperse rápidamente por acción de las olas en las playas, de tal manera que las toxinas y algunos fragmentos de las microalgas son dispersados en forma de aerosol, causando síntomas similares a los del asma, causando consecuencias irreparables en las personas intoxicadas (FAO, 2005; Lagos, 2002).

La microalga *Heterosigma akashiwo*, que pertenece a las *Raphidophyta* produce toxinas semejantes a las brevetoxinas, ha

sido encontrada en aguas costeras y estancadas del Pacífico y del Atlántico. Las floraciones de *H. akashiwo* requieren metales, como hierro y manganeso, además de nitrógeno, fósforo y vitamina B12. Estas sustancias nutritivas son suministradas por desbordes de ríos, también son importantes las aguas del fondo por su bajo contenido de oxígeno y poca turbulencia en los sedimentos del fondo. *Heterosigma akashiwo* tiene un elevado potencial de crecimiento de hasta cinco divisiones diarias, causando la marea roja en un corto período (FAO, 2005).

**c. Distribución**

Se le considera como principal productor de las brevetoxinas al dinoflagelado sin blindaje *Karenia breve*, encontrado de forma persistente en torno a las costas de Florida, cuyas floraciones se inician fundamentalmente a finales de verano y en otoño y también en el Golfo de México (FAO, 2005).

**d. Impactos causados en la maricultura**

Los impactos causados en la maricultura por las toxinas NSP son muy variados, registrándose en la tabla 9, la incidencia en algunos países.

**Tabla 11. Impactos de las toxinas NSP en algunos países del mundo y sus consecuencias en la acuicultura.**

PAISES	AÑOS	ORGANISMOS EN CULTIVO	CONSECUENCIAS
Canadá	--	Peces	Mortalidad de los organismos en cultivo.
USA	2000	Peces	Mortalidad de 1,5 – 2 millones de peces.
Brasil	--	Camarones y moluscos	Riesgo inminente en los cultivos.
México	1994 – 1998	Peces	Mortalidad de los organismos en cultivo.
China	1991	Peces	Mortalidad de los organismos en cultivo.
Japón	1987 – 1989	<i>Seriola quinqueradiata</i> (peces)	Mortalidad de los organismos en cultivo.
Corea	--	Peces	Mortalidad de los organismos en cultivo.
Malasia	--	Peces	Mortalidad de los organismos en cultivo.
Nueva Zelanda	--	Peces	Mortalidad de los organismos en cultivo.

Adaptado de FAO (2005).

#### e. Toxicidad de las toxinas NSP

Las brevetoxinas son sustancias depolarizantes que accionan los canales de sodio de las paredes celulares sensibles al voltaje. De esta forma se alteran las propiedades de membrana de las células excitables favoreciendo el flujo hacia el interior de iones Na<sup>+</sup>. Por incorporación externa de tetrodotoxina puede bloquearse esta corriente. Las brevetoxinas actúan sobre la posición 5 con una estequiometría 1:1 (fig. 14). La toxina produce su efecto al disminuir la despolarización de los canales de sodio para que no se genere el potencial de acción (Correa, 2006; Vendrell, 2006; Whizar *et al.*, ??).

El análisis conformacional muestra que el anillo H no saturado de la brevetoxina B (fig. 15) favorece la conformación “bote” al igual que el anillo G saturado de la brevetoxina A. Por reducción, el anillo H de la brevetoxina B pasa a una conformación “corona”. Este sutil cambio en las preferencias conformacionales induce un cambio significativo en la forma general de la molécula, que se cree causa pérdidas de afinidad y toxicidad (FAO, 2005).

Los problemas respiratorios asociados con la inhalación de brevetoxinas en aerosol son posiblemente debidos en parte a la apertura de los canales de sodio. En ovejas, los broncoespasmos podían bloquearse con atropina, además los mastocitos se bloquean eficazmente con cromolina y clorfeniramina. La liberación de acetilcolina, provoca contracciones moderadas de la tráquea y una liberación masiva de los mastocitos (Fleming & Baden *in* Ardilla, 2006).

Por ser además las brevetoxinas inhibidores enzimáticos de las proteinasas lisosomales conocidas como catepsinas, encontradas mayormente en células fagocíticas como los macrófagos y los linfocitos, es posible que se puedan asociar también a efectos inmunológicos agudos y crónicos (incluida la liberación de intermediarios inflamatorios resultantes en un shock tóxico fatal) con la exposición a brevetoxinas en aerosol (Correa, 2006).

## V. ENSAYOS PARA DETERMINAR FICOTOXINAS MARINAS

La presencia de ficotoxinas en alimentos de origen marino, principalmente en los moluscos, representa un grave problema sanitario y económico de extensa incidencia geográfica y que afecta tanto a países industrializados como en desarrollo (Hernández, 1996). Es por ello de gran importancia contar con un historial de información de las mareas rojas suscitadas en las zonas de cultivo, para poder tomar medidas preventivas en el control de la producción de esas zonas.

Suárez (2004), menciona que en los últimos años, el interés se ha centrado en la búsqueda de un método de detección de toxinas fiable, llegando al punto de un nivel no sólo cualitativo, sino también cuantitativo, donde el tiempo es un factor bastante importante. Teniendo en cuenta lo anterior se han desarrollado métodos que en un tiempo reducido, permiten detectar toxinas en los mariscos a niveles muy por debajo de lo que se consideran un riesgo, estos métodos han superado grandes dificultades como:

- La gran diversidad estructural de estas toxinas que implica diferentes modos de acción y diferentes toxicidades.
- La presencia de toxinas en matrices biológicas complejas y de mezclas de congéneres relacionados y con diferentes potencias tóxicas.
- La ausencia, en la mayoría de estas sustancias, de grupos cromóforos que faciliten su detección por las técnicas convencionales de espectrofotometría UV – Visible o de fluorescencia.

- La aparición de toxinas pertenecientes a diferentes familias en una misma muestra, que representa una complicación adicional a efectos de determinar la toxicidad.
- La posibilidad de biotransformaciones de las toxinas a lo largo de su transmisión en la cadena trófica.
- Las posibles transformaciones durante los procesos de extracción, purificación y análisis.

La detección de toxinas marinas en sus agentes productores o en sus vectores se aborda a través de la aplicación de dos tipos de métodos, atendiendo a la naturaleza de la información obtenida: métodos analíticos o métodos de ensayo como se aprecia en la tabla 10 (Fernández *et al.*, 2002).

**Tabla 12. Métodos para la determinación de toxinas.**

ENSAYOS		ANÁLISIS
ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	
Bionsayos en ratón. Inmunoensayos. Bionsayo de la rata.	Ensayo de Inhibición enzimática. Ensayos celulares. Ensayos de receptor.	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Determinación UV, DAD. Determinación fluorimétrica. Determinación Espectrometría de Masas. Electroforesis capilar.

Fuente: Fernández *et al.* (2002).

Dejando a un lado las valoraciones de carácter económico, la elección de la estrategia de detección se realizará en función a los objetivos de los estudios a realizar. De esta manera, los métodos químicos instrumentales que diferencian y cuantifican las toxinas ya sea individualmente o por grupos, se utilizan mayoritariamente en programas de investigación que requieran el conocimiento de todas y cada una de las toxinas presentes. Mientras, que en los programas de monitoreo o control sanitario se da relevancia al conocimiento de la toxicidad global, por lo que se utilizan más los métodos de ensayo. Así, los programas de control sanitario requieren ensayos rápidos, sensibles, reproducibles, de bajo costo, fáciles de ejecutar y que permitan el análisis de un gran número de muestras. Además, no deben producir falsos negativos y el número de falsos positivos debe ser tan bajo como sea posible (Suárez, 2004).

En el área de determinación de toxinas, el término ensayo, se refiere a aquellos métodos que proporciona un valor del contenido total de toxinas basados en la medición de una única respuesta biológica o química, que engloba la actividad de todos los congéneres presentes de la muestra. La determinación de la toxicidad se lleva a cabo en función de una curva dosis – respuesta, que se realiza usualmente con una de las toxinas representativas del grupo objeto de estudio, expresándose finalmente la toxicidad total en equivalentes a dicha toxina. Dentro de este primer grupo se encuadrarían los bioensayos *in vivo* y los ensayos de inhibición enzimática, los ensayos celulares, los ensayos de receptor, los inmunoensayos y los ensayos electrofisiológicos (Fernández *et al.*, 2002; Sierra & Muñoz, 2004).

Los inmunoensayos más frecuentes utilizados para la determinación de ficotoxinas son los conocidos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay), en los que se mide la interacción toxina – anticuerpo mediante la reacción de una enzima ligada al anticuerpo con un sustrato específico de la misma, reacción que da lugar a un producto coloreado o fluorescente, y por tanto cuantificable (Suárez & Guzmán, ??). Para el caso del AO existe un radioinmunoensayo muy sensible, pero su complejidad evita su uso en la rutina. Además existen dos ELISA desarrollados en forma de kits para la determinación del AO: el “DSP-Check” (Sceti, Tokio, Japón) y el “Okadaic Acid kit” de Rougier Bio-Tech (Montreal), sin embargo, estos métodos no funcionan con toxinas esterificadas (FAO, 2005).

El término análisis según Fernández & Diógenes (??), se refiere a los métodos de detección en las que se realiza una separación, identificación y posterior cuantificación individual de las toxinas en función a una respuesta instrumental que es proporcional a la concentración de cada una de las toxinas presentes en la muestra. Dicha cuantificación requiere de una calibración previa del equipo instrumental con patrones de concentración conocida de cada una de las toxinas objeto de determinación. La respuesta instrumental debe ser convertida posteriormente a valores de toxicidad en función de factores de conversión específicos para cada toxina, de manera que la toxicidad global se determina como una sumatoria de las toxicidades individuales (Sierra & Muñoz, 2004). Este grupo incluye los métodos químicos basados en separaciones de las toxinas por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE/HPLC) y detección colorimétrica, fluorimétrica o por Espectrometría de Masas (MS), así como la Electroforesis Capilar (Suárez & Guzmán, ??).

Las técnicas de HPLC acoplado a detección fluorimétrica (HPLC-FD) son técnicas ampliamente utilizadas en el estudio de estas toxinas, a pesar de sus

limitaciones. Estas técnicas permiten la detección de las toxinas DSP que posean un grupo carboxílico libre en la molécula, es decir, AO, DTX1, DTX2 (FAO, 2005).

De hecho, el método más usado a nivel mundial para la detección de AO y sus homólogos en microalgas y mariscos es el que propuso Lee (*in* Sierra & Muñoz, 2004), que implica el uso de 9-antrildiazometano (ADAM) como fluoróforo. La detección de toxinas DSP esterificadas, tales como diolésteres o DTX4, requieren una hidrólisis previa, puesto que se utiliza el ácido carboxílico para la introducción del resto con fluorescencia. La identificación de estos ésteres en la naturaleza, provocó el establecimiento de un sistema de hidrólisis directa asegurando de esta manera la medida de toxicidad total de la muestra. Sin embargo, este método presenta el inconveniente de que no permite identificar cuál es el éster causante de la toxicidad (Stabell *et al.*, 1993; Suárez, 2004).

El desarrollo y la implantación de técnicas como cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS y LC-MS/MS) ha sido crucial en mejorar el conocimiento de la producción de estas toxinas, necesitándose cantidades mínimas de sustancia. De esta manera, el espectrómetro de masas tiene potencial para analizar todas las toxinas marinas identificadas en la actualidad y detectar análogos de las mismas, siempre que se posea cierta información previa sobre sus estructuras y pesos moleculares (Reguera, 2003; Suárez & Guzmán, ??). La HPLC acoplada a MS/MS permite un grado muy alto de especificidad, ya que la detección de la sustancia se basa en el tiempo de retención cromatográfico, en el peso molecular de la sustancia y en la

información estructural derivada de la presencia de fragmentos diagnósticos para cada análisis (Reguera, 2003; Sierra & Muñoz, 2004).

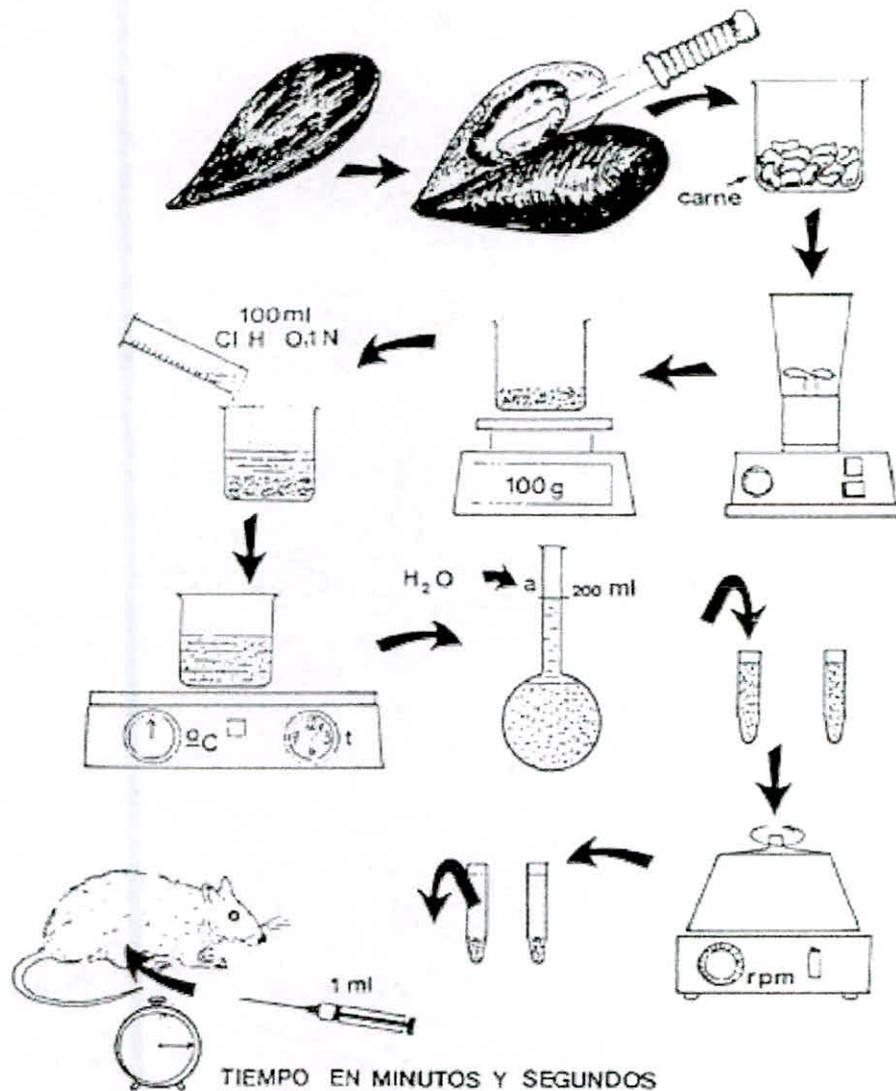
## **5.1. TOXINAS PARALIZANTE (PSP) Y DIARREICAS (DSP) DETERMINADAS POR BIOENSAYOS**

Para la evaluación de la toxicidad los investigadores utilizan un ensayo biológico con animales vivos, relacionando la toxicidad de las muestras de mariscos con el tiempo de muerte de ratones después de la inyección intraperitoneal de un pequeño volumen de un extracto acuoso del tejido de los moluscos sospechosos. Estos estudios contribuyeron al desarrollo en los años 50 de un bioensayo que fue adoptado hasta hoy por la mayoría de los servicios de salud del planeta (Suárez & Guzmán, ??).

### **a) Detección de Veneno Paralizante de los Mariscos (PSP)**

Este método según Sierra & Muñoz (2004), se aprovecha de que las toxinas paralizantes son solubles en agua. De manera resumida (fig. 18), se separan 100 g del tejido de los mariscos, se tritura a homogeneidad en una licuadora en un volumen de agua acidulada con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico, se hierve la suspensión por cinco minutos, se deja decantar los residuos sólidos y enfriar la solución. Se inyecta 1 ml de la solución al peritoneo de 3 ratones de 20 g, luego se anota el tiempo en el cual se produce la muerte de los ratones, observándolos hasta un período de una hora. El tiempo de muerte se relaciona inversamente con la toxicidad del extracto. La toxicidad se establece inyectando a otros ratones cantidades

conocidas de saxitoxina, la sustancia química más tóxica de este grupo de compuestos, de acuerdo a una tabla de relación dosis – tiempo de muerte establecida por Sommer en 1950.



Tomado de Amengual (1990).

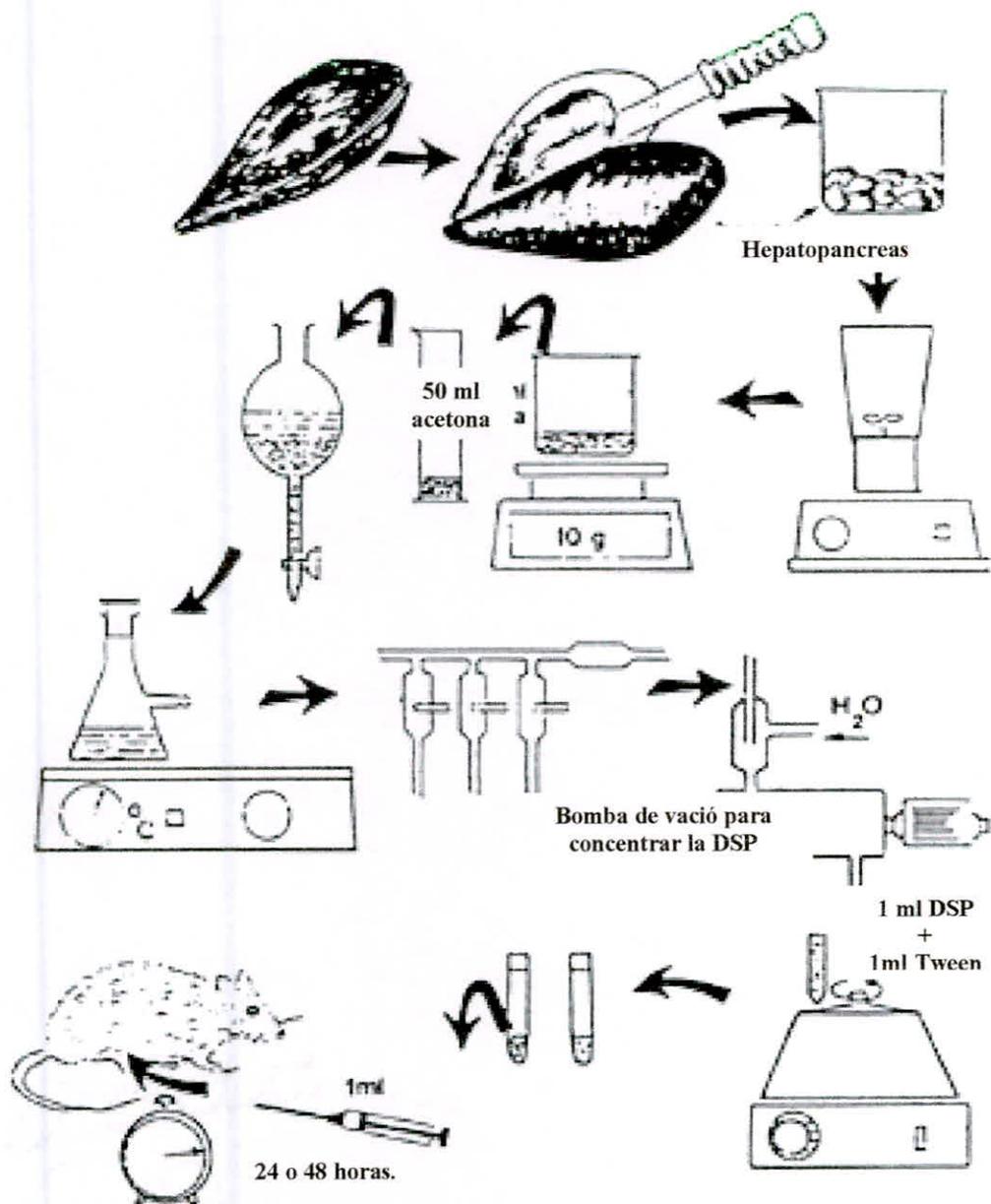
**Fig. 18.** Etapas a seguir para la determinación de biotoxinas del grupo PSP en moluscos con el método del bioensayo en el ratón.

### **b) Detección de Veneno Diarreico de los Mariscos (DSP)**

Este método según Sierra & Muñoz (2004), aprovecha la propiedad de las toxinas diarreicas de ser solubles en aceites y solventes orgánicos.

En este caso se separa el aparato digestivo de mariscos llamado

hepatopáncreas, se trituran 20 g, y se extraen las toxinas con solventes orgánicos como la acetona. La solución de extracción se evapora hasta casi la sequedad y el residuo se disuelve en un pequeño volumen de una solución acuosa que contiene un detergente. Se inyecta 1 ml, en el peritoneo de 3 ratones CF-1 de 20 g y se les mantiene en observación por 24 horas (fig. 19).



Tomado de Amengual (1990).

Fig. 19. Etapas a seguir para la determinación de biotoxinas del grupo DSP en moluscos con el método del bioensayo en el ratón.

## **5.2. TOXINAS PARALIZANTE (PSP) Y DIARREICAS (DSP) DETERMINADAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)**

Sierra & Muñoz (2004), mencionan que la técnica de HPLC es uno de los procedimientos de mayor sensibilidad y gran poder de resolución y se utiliza para la identificación y cuantificación de toxinas paralizantes, diarreicas y amnésicas, entre otras. Su principio de funcionamiento se basa en dos viejas observaciones, probablemente realizada muchas veces por el mismo lector. Una de ellas es la capacidad de ciertos materiales (sustratos) de absorber paulatinamente por capilaridad un solvente. La otra observación es la capacidad del solvente de separar otras sustancias a medida que avanza en el sustrato. Esta separación de colores o cromatografía que es el nombre clásico del fenómeno descrito el cual es el fundamento de las modernas técnicas HPLC. En este caso, los sustratos son columnas metálicas de diámetro variable (de pocos milímetros hasta varios centímetros) que contienen de manera compactada un polvo muy fino. El instrumento permite hacer circular solventes a lo largo de la columna de manera muy controlada y reproducible. El método aprovecha la propiedad de todas las sustancias químicas de migrar a lo largo de un sustrato como el descrito con distinta facilidad, mostrando distintos tiempos para recorrer un segmento de la columna cromatográfica. Estos diferentes tiempos de retención en la columna, es lo que se aprovecha ingeniosamente para detectar en el extremo de la salida de la columna, las sustancias que vayan saliendo primero. Es así como puede añadirse un pequeño volumen de muestra al

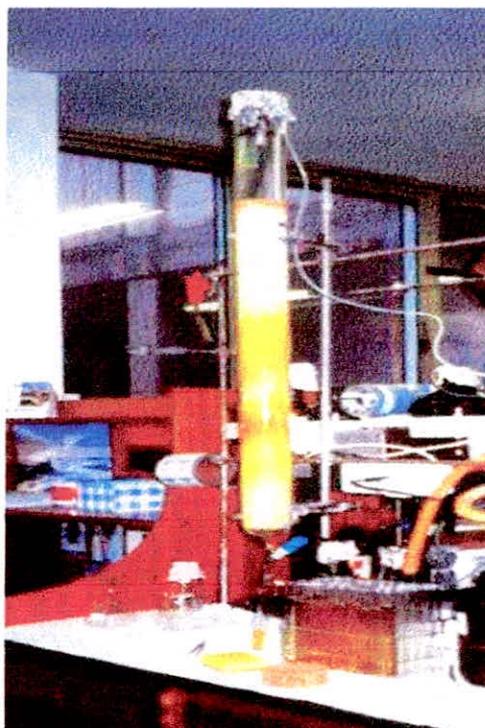
comienzo de la columna (ejemplo 10 microlitros, una gota de agua corresponde a cerca de 20 microlitros), detectándose sus componentes a la salida por métodos ópticos.

La identidad y cantidad de cada componente en una muestra desconocida se determina realizando controles en los que se agregan a la columna HPLC, concentraciones conocidas de sustancias puras (estándares), como referencia para determinar las sustancias tóxicas en las muestras de los moluscos (Buenadicha, 2006; Suárez, 2004).

La técnica HPLC para venenos paralizantes y diarreicos fue desarrollada con gran perfección en el Japón por Takeshi Yasumoto y Yasukatsu Oshima, logrando identificar más de 22 saxitoxinas de estructura muy relacionada con la PSP pero con grandes diferencias en la toxicidad de cada una de ellas (Fernández *et al.*, 2002).

Es importante destacar que los PSP y DSP, son mezclas complejas de varios componentes cuyas proporciones varían para cada especie de microalga tóxica y dentro de cada especie en dependencia de las condiciones ambientales (Fernández *et al.*, 2002). En el caso del PSP, la metodología HPLC involucrada es relativamente más simple y tiene un nivel de detección suficiente para cumplir las normas sanitarias que es < 20 microgramos de ácido domoico por gramo de tejido (Suárez & Guzmán, ??).

En la figura 20 se muestra un equipo de cromatografía para determinar determinados tipos de toxinas mencionadas anteriormente.



Tomado de Suárez (2004).

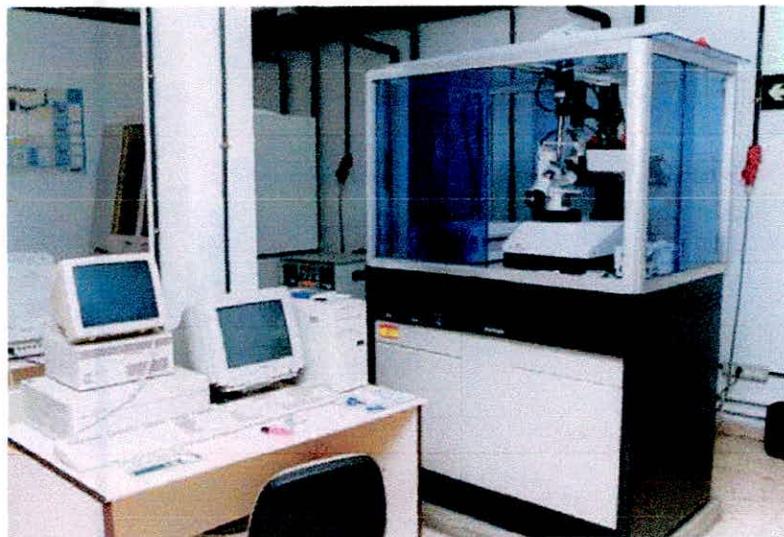
**Fig. 20.** Equipo de cromatografía marca Sephadex LH-20.

### **5.3. RADIOENSAYOS PARA DETERMINAR TOXINAS PARALIZANTES (PSP)**

Esta técnica se basa en la alta afinidad de las toxinas paralizantes (saxitoxinas) a las moléculas del canal de sodio. Esta afinidad se produce por la fuerte interacción de tipo “llave y cerradura” que se produce entre el ligando saxitoxina y una región pequeña (sitio de unión) del canal de sodio (Ardilla, 2001). Esta fuerte interacción es duradera y cierra el poro o canal, impidiendo el paso de los iones sodio desde el exterior al interior de las células. Este bloqueo inhibe la generación y la conducción de los impulsos nerviosos (Vendrell, 2006).

En este método los canales de sodio se “marcan” primero con una saxitoxina radioactiva. Si el extracto de la muestra de mariscos contiene

saxitoxinas naturales, estas moléculas van a competir y desplazar a su análogo radioactivo ligados al canal de sodio, por estar en mayor cantidad. En ese caso, los canales de sodio pierden la marca radioactiva y la radioactividad detectable será muy baja. Si el extracto no contiene saxitoxinas, el canal de sodio se mantendrá marcado y su radioactividad será relativamente elevada. Las emisiones radioactivas se miden en un “contador de centelleo”, equipamiento habitual en hospitales y clínicas donde es usado en radioinmunoensayos hormonales (fig. 21). Esta técnica es mil veces más sensible que el bioensayo ratón y puede aplicarse a decenas de muestras simultáneas (Sierra & Muñoz, 2004; Suárez & Guzmán, ??).



Tomado de Suárez (2004).

**Fig. 21. Equipo de difractómetro ENRAFNONIU.**

#### **5.4. ENSAYOS COLORIMETRICOS PARA DETERMINAR TOXINAS DIARREICAS (DSP)**

Esta técnica está basada en la propiedad de las toxinas diarreas ácido okadaico y algunos de sus derivados, de inhibir a muy bajas concentraciones la actividad de enzimas denominadas serina – treonina proteína fosfatasa. Estas fosfatasas cumplen la importante función de eliminar grupos fosfato de otras proteínas y enzimas, actuando de conjunto con otras enzimas, las fosfoquinasas, que hacen lo contrario, esto es, adicionan grupos fosfato. El grado de fosforilación de proteínas, enzimas y canales iónicos, es un aspecto esencial en el balance de la actividad metabólica celular (Sandrine & Catterall, 2000; Vendrell, 2006).

En este método se utiliza una proteína fosfatasa pura obtenida por técnicas recombinantes. Si esta enzima se deja actuar frente a un sustrato que está fosforilado en ausencia de inhibidores, va a eliminar todos los grupos fosfatos existentes en el sustrato. Estos aniones fosfato liberados dan una reacción química coloreada fácilmente visible. Si la enzima es inhibida por las toxinas diarreas, se producirán menos aniones fosfato libres y habrá menor desarrollo del color. Así una muestra muy tóxica dará un producto de reacción incoloro, mientras que una muestra inocua generará un producto de reacción coloreado, de esa manera se pueden cuantificar niveles de toxinas diarreas que están hasta 1000 veces por debajo del límite regulatorio ( FAO, 2005; Suárez & Guzmán, ??).

## 5.5. TOXINA AMNÉSICA DE MOLUSCO (ASP: “AMNESIC SHELLFISH POISONING”)

### a) En enlace con receptores

Se desarrolló para el DA, un ensayo de enlace competitivo con receptores de micro placa que emplea sinaptosomas de cerebro de rana (*Rana pipiens*). El análisis del DA está basado en la competencia con el ácido cainico radiomarcado-[3H] por el enlace con el receptor de cainato/quisqualato glutamato, este método parece ser muy sensible y muy prometedor como ensayo automatizado y rápido para determinar DA en muestras de mariscos contaminados y de fitoplancton. Los resultados preliminares indicaron una buena correlación cuantitativa con el método del fluorenilmetoxicarbonilo-HPLC, en los extractos de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (FAO, 2005).

### b) Ensayos químicos

#### Cromatografía de capa fina

El DA puede determinarse por cromatografía de capa fina con un punto de absorción UV débil que se vuelve amarillo luego de nebulizarlo con ninhidrina al 1%. Este método interfiere con los aminoácidos normales presentes en los extractos crudos, que deben separarse. Esto se logra para las muestras de plancton con dos cromatografías en capa fina bidimensional no se pueden analizar directamente, los extractos crudos de tejidos de mariscos por ser muy complejos. La cromatografía de capa fina unidimensional, su límite de

detección por este método, para el DA, es de alrededor de 0,5  $\mu\text{g}$ , lo que permite la detección en tejidos de marisco a alrededor de 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  (FAO, 2005).

### **Cromatografía Líquida (CL)**

El DA puede analizarse y aislarse, por CL o por cromatografía de intercambio iónico con detector UV. Las separaciones más rápidas y eficientes se logran con CL-UV de fase revertida. Se recomienda emplear una fase móvil ácida para suprimir la ionización de las funciones carboxilo, en tanto que se logra una mejor manera de separación selectiva del DA y sus isómeros con fases octadecilsilica "tipo polímero". La CL-UV es actualmente la técnica analítica preferida para analizar DA en mariscos disponiéndose de un método, validado formalmente para mejillones; la detección del DA se facilita por su fuerte absorbancia a 242 nm (FAO, 2005).

Se ha informado de un método automático rápido y sensible para determinar DA con CL empleando, un sistema de sustitución de columna con detector UV. Los picos de interferencia resultantes de componentes de la matriz proteica se separan mediante una columna con CL de fase inversa expresamente diseñada para una separación previa. El método es adecuado para extractos de almejas y algas. La muestra se extrae con agua pura y el extracto crudo se inyecta directamente en el capilar. El sistema de sustitución de columnas eliminó la necesidad de cualquier otra limpieza de la muestra luego de la extracción (FAO, 2005). El límite de detección CL-UV para el DA es de unos 10-80  $\text{ng ml}^{-1}$ , dependiendo de la sensibilidad del detector UV

empleado. El límite de detección en los tejidos depende del método de extracción y limpieza.

### **Electroforesis Capilar (EC)**

Este método relativamente simple permite separaciones rápidas y de alta resolución de compuestos polares complejos. Se conecta un tubo capilar delgado de sílice fundido conteniendo una solución tampón entre dos contenedores de líquido. Luego de inyectar en el capilar un volumen pequeño de extracto de muestra (usualmente 1-10 nl), se aplica una diferencia de voltaje de 20 – 30 kilo voltios (kV) a los extremos del capilar. Las sustancias iónicas migran hacia abajo como bandas delgadas pasando por un detector de absorbancia UV o fluorescencia (FAO, 2005).

El límite de detección en los tejidos húmedos fue de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ . En 10 minutos se separaba fácilmente el DA de los componentes de la matriz de muestra de almejas. Con excelentes límites de detección de masa, el método EC requiere solamente muestras de 3 a 15 nl pudiendo emplearse cuando el tamaño de las muestras está severamente limitado (FAO, 2005).

### **Espectrometría de Masas**

Reguera (2003) y Suárez (2004), mencionan que la espectrometría de masa se ha convertido en la técnica predominante para las interfases entre CL y EM, volviendo obsoletos otros métodos, ya que la detección de la sustancia se basa en el peso molecular de la sustancia

y en la información estructural derivada de la presencia de fragmentos diagnósticos para cada análisis (fig. 22)



Tomado de Suárez (2004).

**Fig. 22. Espectrómetro VG-Autospec FIONS, para determinación de toxinas por espectro de masa.**

## VI. DISCUSIÓN

La literatura científica es clara y amplia sobre el tema de las FAN (Álvarez *et al.*, ??; Anderson *et al.*, 2002; Buschmann, 2005; Hernández, 1996; Smayda, 2002). En el pasado los procesos oceanográficos, biológicos y físico – químicos, condicionaron la abundancia de floraciones de microalgas. Sin embargo, el aumento de su frecuencia e intensidad durante las últimas décadas apunta directamente hacia diversos procesos antropogénicos, los que están potenciando las FAN a lo largo de todo el planeta. El ecosistema marino peruano es un claro ejemplo de este proceso evidenciados por ejemplo en las bahías El Ferrol y Samanco, ubicados en el litoral del departamento de Ancash.

No obstante esta problemática las investigaciones en el Perú están en una etapa de estudios cuantitativos, llevada a cabo por instituciones como el IMARPE y el ITP; estas organizaciones muestrean las aguas del mar cada quince días en los lugares donde se realiza el cultivo de moluscos por medio de la maricultura, no llegando a difundir sus resultados de modo sistematizado en los medios de comunicación. La información que presenta el ITP, revela un incremento paulatino de las microalgas que producen toxinas y que en un tiempo no muy lejano podrían causar problemas que no solo estén relacionadas a la mortandad de los cultivos por falta de oxígeno, sino también a posibles bioacumulaciones de ficotoxinas que originen problemas en la maricultura y la salud humana.

Por lo antes señalado sería importante comenzar estudios minuciosos y concienzudos, de los actuales procesos de formación de las FAN en de las diferentes zonas donde se realiza la extracción de moluscos, así como también en las zonas de cultivos destinadas a la maricultura en el Perú fin de tener información base sobre como están afectando los procesos de eutrofización en

la aparición de las FAN, las épocas en las que mayormente se presentan y la permanencia que presentan en el tiempo en las diferentes zonas geográficas de donde se encuentren los moluscos.

Buschmann (2005) y Smayda (2002), describen que puede existir una potencial proliferación de algas tóxicas, cuando se cultivan organismos de alto nivel trófico como es el caso de los cultivos de peces, mejillones, vieiras, etc., ya que tienden a causar sobre el medio marino un impacto significativo, por sus aportes de nitrógeno y fósforo que facilitan la proliferación o hasta en algunos casos la modificación de determinadas especies de microalgas inocuas que más adelante causarán daño a los organismos en cultivo y a los organismos del ecosistema marino. Los productos metabólicos originados por el crecimiento de la maricultura deben ser considerados por el actual dimensionamiento y por el alto potencial de crecimiento que tendrá esta actividad en el futuro, llegando a ser la causante de impactos significativos en las bahías del Perú, ya que esta actividad estaría alterando el ambiente, contribuyendo de esa manera a la proliferación de FAN, lo que a su vez sería un riesgo inminente al cierre del mercado de algunos países hacia los productos procedentes del Perú, con la consecuente pérdida de divisas para nuestra región y el país.

Así mismo también se debe tener en cuenta las actividades humanas no controladas como las emisiones urbanas y agrícolas, que deberían estar en el centro de la discusión por el gran impacto que originan en los ambientes marinos, llegando a ser una de las principales causas del incremento de las FAN en todo el mundo en las últimas décadas.

En una encuesta realizada a las personas que laboran en la bahía Samanco sobre el tema de las mareas rojas, se determinó que las FAN, son de

una duración variable yendo desde algunas horas hasta algunas semanas, esta variación de tiempo se debe principalmente a las condiciones que presentan las corrientes dentro de la bahía, siendo apropiadas para la formación de las FAN las áreas que presentan una estratificación, y siendo inapropiadas las áreas con frecuente circulación.

Los ingenieros de las empresas PETMAR, SOMEX SAC y los pescadores artesanales mencionan que en la bahía Samanco las FAN se presentan con mayor frecuencia en los meses de verano, llegando a causar estragos a los productores de “concha de abanico” *A. purpuratus*, como son la mortalidad de los organismos de cultivo por las condiciones de anoxia, obligando a los maricultores a mover los sistemas de cultivo hacia la superficie, lo que ocasiona un mayor número de desdobles en el cultivo por el aumento del fouling, incrementa el costo de producción de las especies en cultivo. Así también los pescadores artesanales mencionan que las FAN hacen que algunas especies de peces comerciales se ausenten de las zonas normales de pesca, así como la mortandad de los bancos naturales de *A. purpuratus* existentes en la zona trayendo consigo una disminución de organismos para el mercado local.

En algunos países que presentan frecuentes formaciones de FAN en sus mares, como son: Canadá, España, China, Japón, etc., se están realizando estudios sobre la dinámica de cada una de las especies de microalgas tóxicas que originan las floraciones en los ecosistemas marinos, así también se vienen realizando en los laboratorio estudios en los que se determinan bajo que concentraciones específicas de nitrógeno, fósforo y otros elementos esenciales, las microalgas forman las ficotoxinas que causarán daño en los organismos del ambiente marino, los organismos en cultivo y a los seres humanos.

## VII. CONCLUSIONES

De lo planteado anteriormente se concluye en iniciar estudios integrales y dinámicos de las FAN y sus causas teniendo en consideración la eutroficación, como eje prioritario que puede desencadenar dichos procesos, apuntando hacia las emisiones antropogénicas de cargas contaminantes, tratando de disminuir la cantidad de nutrientes como el nitrógeno y fósforo principalmente de los diferentes ambientes donde se realiza la maricultura. Así también se debe desarrollar un estudio base en lo posible semanal de las FAN, en donde se debe tener en cuenta los géneros tóxicos en forma cuantitativa, las épocas en que se presentan y la permanencia en los ambiente a nivel nacional como en la bahía Samanco, para poder determinar y prevenir posibles procesos de intoxicación por mariscos en nuestro país ya sea de actividades extractivas o de cultivo.

Además, también se debe de comenzar a desarrollar modelos sustentables en la maricultura por medio de un sistema de cultivos integrados (cultivo de macroalgas), donde se considere disminuir los productos metabólicos originados por la maricultura de tal manera que se tienda a causar un menor daño al ecosistema, logrando para ello concienciar a las personas que trabajan en la maricultura, sobre los altos riesgos de las perturbaciones de los ecosistemas marinos y sus posibles efectos en la proliferación de las FAN.

Implementar en las universidades cursos donde se realicen estudios integrados que comprendan la dinámica poblacional de las algas nocivas, la taxonomía y la genética de los organismos causantes de FAN, determinando los mecanismos fisiológicos y bioquímicos responsables de la producción de toxinas,

evaluando sus efectos en los organismos marinos y en la salud humana; teniendo en cuenta para esto la intervención de los esfuerzos conjuntos y coordinados de diversas instituciones públicas y privadas nacionales con el fin de desarrollar procedimientos de prevención y mitigación.

## VIII. RECOMENDACIONES.

Implementar estudios base minuciosos y concienzudos de las FAN que se presentan a nivel nacional, así como la implementación de programas de policultivos en la maricultura (macrolaga), con el fin de poder disminuir la cantidad de nitrógeno y fósforo, provenientes de los procesos antropogénicos y la maricultura, que son los causantes de considerables impactos en los ecosistemas marinos a nivel mundial.

Elaborar y publicar elementos de información escrita, que contribuyan a difundir el conocimiento y la comprensión de las FAN, en la comunidad en general, a través del desarrollo de una red de información y educación, para prevenir posibles daños en la salud pública.

Implementar en las universidades cursos donde se realicen estudios integrados que comprendan la dinámica poblacional de las algas nocivas, la taxonomía y genética de los organismos causantes de FAN; teniendo en cuenta para esto la intervención de los esfuerzos conjuntos y coordinados de diversas instituciones públicas y privadas.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN, E. 1993.** Manejo de reproductores. Memorias del II curso internacional cultivo de moluscos. Univ. Católica del Norte, Coquimbo, Chile.
- ÁLVAREZ, C. & J. HERRERA. ??.** Cuando el mar cambia de color: florecimientos algales. Disponible en: [www.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/julsep05/mar.pdf](http://www.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/julsep05/mar.pdf) (28 de Mayo del 2007).
- AMENGUAL, J. 1990.** Report of the workshop and study tour on mollusc sanitation and marketing in Spain. Disponible en: [www.fao.org/docrep/field/003/AB710E/AB710E24.htm](http://www.fao.org/docrep/field/003/AB710E/AB710E24.htm). (28 de agosto del 2007).
- ANDERSON, D.; P. GLIBERT & J. BURKHOLDER. 2002.** Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. Disponible en: [www.whoi.edu/redtide/labweb/publications/Anderson etal 2002 Estuaries.pdf](http://www.whoi.edu/redtide/labweb/publications/Anderson%20etal%202002%20Estuaries.pdf) (28 de Mayo del 2007).
- ANÓNIMO. 2001.** Monitoreo de las condiciones ambientales en la bahía de Paracas. Disponible en: [http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw\\_camiseactividades/Informe%20del%20Monitoreo%20de%20las%20Condiciones%20Ambientales%20en%20la%20B.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw_camiseactividades/Informe%20del%20Monitoreo%20de%20las%20Condiciones%20Ambientales%20en%20la%20B.pdf) (18 de Julio del 2007).
- ANÓNIMO. 2002.** Algas y cianobacterias en aguas costeras y estuarinas. Disponible en: [www.crid.or.cr/crid/CD\\_Agua/pdf/spa/doc14617/doc14617-6.pdf](http://www.crid.or.cr/crid/CD_Agua/pdf/spa/doc14617/doc14617-6.pdf) (30 de Mayo del 2007).
- ARANIBAR, N. & F. SIGUEÑAS. ??.** Potencial de membrana o potencial de acción. Disponible en: [www.monografias.com/trabajos41/potencial-membrana/potencial-membrana2.shtml](http://www.monografias.com/trabajos41/potencial-membrana/potencial-membrana2.shtml) (23 de Agosto del 2007).

- ARDILLA, L. 2001.** Estudio de los mecanismos de acción de las ficotoxinas marinas. Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: [WWW.descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/06929512044658540832268/0053471.pdf](http://WWW.descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/06929512044658540832268/0053471.pdf) (28 de Mayo del 2007).
- ARZUL, M. SEGUEL & A. CLEMENT. 2001.** Effect of marine animal excretions on differential growth of phytoplankton species. Disponible en: [www.springerlink.com/index/LNX8882602468775.pdf](http://www.springerlink.com/index/LNX8882602468775.pdf) (28 de Mayo del 2007).
- BAUTISTA, C. 1989.** *Moluscos tecnología de cultivo*. Edic. Mundi Prensa. Madrid, España. 169 p.
- BUENADICHA, A. 2006.** Biotoxinas marinas en moluscos bivalvos. Disponible en: [ww.uam.es/.../eeymar/defaultarchivos/Trabajostoxicologiaalimentaria0607/BIOTOXINASangelbuenadicha.pdf](http://ww.uam.es/.../eeymar/defaultarchivos/Trabajostoxicologiaalimentaria0607/BIOTOXINASangelbuenadicha.pdf) (28 de Mayo del 2007).
- BUSCHMANN, A. 2005.** Mareas rojas y salmonicultura en el sur de Chile. OCEANA 14, Chile. Disponible en [www.oceana.org/fileadmin/oceana/uploads/americanadelsur/documentos2005/MareaRoja.pdf](http://www.oceana.org/fileadmin/oceana/uploads/americanadelsur/documentos2005/MareaRoja.pdf). (28 de Mayo del 2007).
- CHAMBERLAIN, G. 1999.** Situación de la acuicultura en las regiones de Asia y América latina. *In libro de resúmenes: Taller internacional "Acuicultura sostenible: Desarrollo y Comercio"*, 9 Junio de 1999 PEEC. Ministerio de Pesquería. Lima, Perú.
- CHÁVEZ, Y.; R. CUBA & L. RIVERA. 2005.** Floraciones algales nocivas "fitoplancton tóxico". Disponible en: [www.monografias.com/trabajos32/floraciones-algales-nocivas/floraciones-algales-nocivas.shtml](http://www.monografias.com/trabajos32/floraciones-algales-nocivas/floraciones-algales-nocivas.shtml) (23 de Agosto 2007).
- CORREA, C. 2006.** Sustancias tóxicas de origen animal en los alimentos marinos: intoxicación por consumo de mariscos. Disponible en: [www.uam.es/.../default\\_archivos/Trabajostoxicologiaalimentaria0607/T oxinas\\_AnimalesMarinosCarolinaCorrea.pdf](http://www.uam.es/.../default_archivos/Trabajostoxicologiaalimentaria0607/T oxinas_AnimalesMarinosCarolinaCorrea.pdf) (28 de Mayo del 2007).

- CUNNINGHAM, J. 1995.** *Fisiología veterinaria*. Edit. Interamericana, S.A. México, D.F. 716 p.
- FAO. 2005.** Biotoxinas marinas. Disponible en: [www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm](http://www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm) (30 de Mayo del 2007).
- FAO. 2006.** Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699s/a0699s00.pdf> (10 de Agosto del 2007).
- FERNÁNDEZ, I.; A. MÍGUEZ; E. CACHO; A. MARTÍNEZ; J. DIOGÉNES & T. YASUMOTO. 2002.** Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. *In* floraciones algales nocivas en el cono sur americano SAR, E; M. FERRARIO & B. REGUERA (eds.), Instituto Español de Oceanografía. 77 – 120 pp. Disponible en: [www.ioc.unesco.org/ghab/conosur%20completo%20corregido.pdf](http://www.ioc.unesco.org/ghab/conosur%20completo%20corregido.pdf) (30 de Mayo del 2007).
- FERNÁNDEZ, M. & A. CEMBELLA. 1995.** *Manual on harmful marine microalgae*. Disponible en: [www.jodc.go.jp/info/ioc\\_doc/Manual/126624m.pdf](http://www.jodc.go.jp/info/ioc_doc/Manual/126624m.pdf) (10 de Julio del 2007).
- FERNANDEZ, M. & J. DIÓGENES. ??.** Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de toxinas. Madrid. España. 42 p.
- GÓMEZ, S. 1996.** Florecimiento del plancton tóxico. *In* Resumen de las disertaciones, preguntas y respuestas de la mesa redonda sobre “mareas rojas” (o discoloración por florecimientos algales). Reunión Internacional de Planctología y VIII Reunión Nacional de la SOMPAC. 23 – 26 de abril, Michoacán, México. 47 – 54 pp.
- HALLEGRAEFF, G. & Y. HARA. 1995.** Taxonomy of harmful marine raphidophytes. UNESCO. Disponible en: [www.springerlink.com/index/BR2X5MF3H59494Y7.pdf](http://www.springerlink.com/index/BR2X5MF3H59494Y7.pdf) (30 de Mayo del 2007).

- HERNÁNDEZ, B. 1996.** Especies tóxicas y potenciales florecimiento del plancton tóxico. *In* Resumen de las disertaciones, preguntas y respuestas de la mesa redonda sobre “mareas rojas” (o discoloración por florecimientos algales). Reunión Internacional de Planctología y VIII Reunión Nacional de la SOMPAC. 23 – 26 de abril, Michoacán, México. 55 – 56 pp.
- IMARPE. 2005.** Secuencia de eventos relacionada a la “marea roja” registrada entre el 20 de enero y 15 de febrero del 2005. Disponible en: [www.camisea.com.pe/esp/reports/costa/2005/Febrero/Anexo%204.%20Informe%20Marea%20Roja.pdf](http://www.camisea.com.pe/esp/reports/costa/2005/Febrero/Anexo%204.%20Informe%20Marea%20Roja.pdf) (10 Julio del 2007).
- IMARPE. 2006.** Monitoreo piloto de fitoplancton potencialmente toxico en Chincha – Pisco, disponible en: [www.imarpe.gob.pe/imarpe/fito\\_menu\\_2006.php](http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/fito_menu_2006.php) (30 de Mayo del 2007).
- IMARPE. 2007.** Monitoreo piloto de fitoplancton potencialmente toxico en Chincha – Pisco. Disponible en: [www.imarpe.gob.pe/imarpe/fito\\_menu\\_2006.php](http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/fito_menu_2006.php) (30 de Mayo del 2007).
- ITP. 2006.** Monitoreo de fitoplancton potencialmente tóxico concesiones cultivo de *Argopecten purpuratus* “Concha de abanico” departamentos de Piura, Ancash, Lima e Ilo. 2006. Disponible en: [www.itp.org.pe/Moluscos/pdf/piura%20ancash%20lima/Fitoplacton/Guaynuna,Isla%20Otortugas,Salinas%20II%20quin.pdf](http://www.itp.org.pe/Moluscos/pdf/piura%20ancash%20lima/Fitoplacton/Guaynuna,Isla%20Otortugas,Salinas%20II%20quin.pdf) (10 de Julio del 2007).
- ITP. 2007.** Monitoreo de fitoplancton potencialmente tóxico concesiones cultivo de *Argopecten purpuratus* “Concha de abanico” departamentos de Piura, Ancash, Lima e Ilo. 2007. disponible en: <http://www.itp.org.pe/Moluscos/pdf/piura%20ancash%20lima/Fitoplacton/Guaynuna,Isla%20Otortugas,Salinas%20II%20quin.pdf> (10 de Julio del 2007).

- JAMES, K.; A. BISHOP; B. HEALY; C. RODEN; I. SHERLOCK; M. TWOHIG; R. DRAISCI; L. GIANNETTI & L. LUCENTINI. 1999.** Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. Disponible en: [www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/reprint/kfh139v1.pdf](http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/reprint/kfh139v1.pdf). (15 de Julio del 2007).
- LAGOS, N. 2002.** Principales toxinas de origen Fitoplanctónico: identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *In* Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano; SAR, E; M. FERRARIO & B. REGUERA (eds.), Instituto Español de Oceanografía. 55 – 76 pp. Disponible en: [www.ioc.unesco.org/hab/conosur%20completo%20corregido.pdf](http://www.ioc.unesco.org/hab/conosur%20completo%20corregido.pdf) (15 de Julio del 2007).
- MOESTRUP, O. 1994.** Economic aspects: blooms, nuisance species and toxins. Disponible en: [www.int-res.com/articles/ame/14/a014p155.pdf](http://www.int-res.com/articles/ame/14/a014p155.pdf) (10 de Julio del 2007).
- MUÑOS, L. 1996.** Intoxicación humana por marea roja. *In* Resumen de las disertaciones, preguntas y respuestas de la mesa redonda sobre “mareas rojas” (o discoloración por florecimientos algales). Reunión Internacional de Planctología y VIII Reunión Nacional de la SOMPAC. 23 – 26 de abril, Michoacán, México. 57 – 68 pp.
- NIELSEN, M. 1993.** Toxic effect of the marine dinoflagellate *Gymnodinium galatheanum* on juvenile *Gadus morhua*. Disponible en: [www.int-res.com/articles/meps/95/m095p273.pdf](http://www.int-res.com/articles/meps/95/m095p273.pdf). (20 de Julio del 2007).
- QUILLIAM, M. 2003.** *Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin*. Disponible en: [www.glf.dfo-mpo.gc.ca/daprradp/docs/quilliam\\_ch9\\_da\\_ioc\\_hab\\_manual\\_2003.pdf](http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/daprradp/docs/quilliam_ch9_da_ioc_hab_manual_2003.pdf) (20 de Julio del 2007).
- REGLAMENTO DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO Nº (CE) 853/2004.** Disponible en: [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2004/l\\_226/l\\_22620040625es00830127.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2004/l_226/l_22620040625es00830127.pdf) (23 de Agosto del 2007).

- REGUERA, B. 2002.** Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. *In* floraciones algales nocivas en el cono sur americano SAR, E; M. FERRARIO & B. REGUERA (eds.), Instituto Español de Oceanografía. 77 – 120 pp. Disponible en: [www.ioc.unesco.org/hab/conosur%20completo%20corregido.pdf](http://www.ioc.unesco.org/hab/conosur%20completo%20corregido.pdf) (30 de Mayo del 2007).
- REGUERA, B. 2003.** Biología, autoecología y toxicología de las principales especies del género *Dinophysis* asociadas a episodios de Intoxicación Diarreogénica por Bivalvos (DSP). Disponible en: [www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-0628104-112836//TESISREGUERA.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0628104-112836//TESISREGUERA.pdf) (20 de Julio del 2007).
- RESOLUCIÓN RM N° 730-2003-SA/DM.** Disponible en: [www.conam.gob.pe/documentos/Novedades/ECA%20Agua2.pdf](http://www.conam.gob.pe/documentos/Novedades/ECA%20Agua2.pdf) (23 de Agosto del 2007).
- ROSET, J.; S. AGUAYO & M. MUÑOZ. 2001.** Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. Disponible en: [www.accede.org/papers/cianobacterias.pdf](http://www.accede.org/papers/cianobacterias.pdf) (24 de Agosto del 2007).
- SAN MILLAN, M. & M. IBAÑEZ. 1991.** Mareas Rojas. Sarcotoxismo. Disponible en: [www.ingeba.euskalnet.net/lurralde/lurranet/lur04/sami04/04sami.htm](http://www.ingeba.euskalnet.net/lurralde/lurranet/lur04/sami04/04sami.htm) (30 de Mayo del 2007).
- SÁNCHEZ, S. 2007.** Reporte de floraciones algales “mareas rojas” en el litoral Peruano (enero 2007). IMARPE. Disponible en: [www.imarpe.gob.pe/imarpe/graf\\_alerta\\_2007/marea\\_verano\\_2007.pdf](http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/graf_alerta_2007/marea_verano_2007.pdf) (20 de Julio del 2007).
- SANDRINE, C. & W. CATTERALL. 2000.** *Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltagegated sodium channels.* Disponible en: [www.jbc.org/cgi/reprint/M603814200v1.pdf](http://www.jbc.org/cgi/reprint/M603814200v1.pdf). (20 de Julio del 2007).
- SCOGING, A. 1998.** Marine biotoxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 84: 41s – 50s.

- SIERRA, A. & L. MUÑOS. 2004.** Metodología HPLC y técnicas novedosas para la detección de toxinas. *In* Manual de técnicas bioquímicas aplicadas en ficología. CIBNOR. Baja California, México. 41 – 70 pp.
- SIERRA, A. & L. IBARRA. 2004.** Metodología HPLC y técnicas novedosas para la detección de toxinas. *In* Manual de técnicas bioquímicas aplicadas en ficología. México. 25 Octubre – 5 Noviembre. 41 – 71 pp.
- SMAYDA, T. 2002.** Adaptative ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. Disponible en: [www.resources.ca.gov/ocean/cwo06/PDF/abstracts.pdf](http://www.resources.ca.gov/ocean/cwo06/PDF/abstracts.pdf). (20 de Julio del 2007).
- STABELL, O.; K. PEDERSEN & T. AUNE 1993.** Detection and separation of toxins accumulated by mussels during the 1988 bloom of *Chrysochromulina polyepis*. Disponible en [www.tpwd.state.tx.us/landwater/water/environconcerns/hab/media/report.pdf](http://www.tpwd.state.tx.us/landwater/water/environconcerns/hab/media/report.pdf). (20 de Julio del 2007).
- SUÁREZ, L. & L. GUZMÁN ??.** Floraciones de algas nocivas mareas rojas y toxinas marinas. Disponible en: [www.marearaja.cl/IMG/pdf/libro\\_marea\\_roja\\_BSuarezLGuzman.pdf](http://www.marearaja.cl/IMG/pdf/libro_marea_roja_BSuarezLGuzman.pdf). (29 de Julio del 2007).
- SUÁREZ, B. 2004** Estudio sobre toxinas marinas de naturaleza polietérea, aislamiento, elucidación estructural y evaluación de su potencial farmacológico. Disponible en: [www.tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp195.pdf](http://www.tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp195.pdf). (29 de Julio del 2007).
- VENDRELL, I. 2006.** Evaluación y desarrollo *in vitro* para la predicción de neurotoxicidad. Aproximación proteómica a la neurotoxicidad del metilmercurio. Universidad de Barcelona. Disponible en: [www.tdx.cesca.es/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-0601107-115950](http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0601107-115950) (25 de Julio del 2007).
- VERA, G.; S. FRAGA; J. FRANCO & G. SÁNCHEZ. 1999.** Primer registró en el Perú del dinoflagelado *Alexandrium affine* Inove y Fukuyo. Inf. Prog. Inst. Mar Perú, (105).

- VIVIANI, R. 1992.** Eutrophication, marine biotoxins, human health. Disponible en: [www.utsa.edu/lrsg/Teaching/EES5053-06/project/Amber&sergio.pdf](http://www.utsa.edu/lrsg/Teaching/EES5053-06/project/Amber&sergio.pdf) (8 de Junio del 2007).
- WHIZAR, V.; J. FLORES & G. PUERTA. ??.** Toxicidad de los anestésicos locales. Disponible en: [http://www.anestesia-dolor.org/anestesia/docs/toxicidad delos anestesisicos locales.html](http://www.anestesia-dolor.org/anestesia/docs/toxicidad%20delos%20anestesisicos%20locales.html) (23 de Agosto del 2007).
- WRIGHT, J. & M. QUILLIAM. 1995.** Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. Disponible en: [www.ioc.unesco.org/iocweb/iocpub/iocpdf/mg031v01.pdf](http://www.ioc.unesco.org/iocweb/iocpub/iocpdf/mg031v01.pdf) (8 de Junio del 2007).
- WRIGHT, J. 1995.** Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Research International* 28(4): 347-358 pp.
- YASUMOTO, T.; IGARASHI T. & SATAKE, M. 2001.** Chemistry of phycotoxins-structural elucidation. Disponible en: [www.iupac.org/publications/pac/2003/pdf/7502x0325.pdf](http://www.iupac.org/publications/pac/2003/pdf/7502x0325.pdf) (8 de Junio del 2007).

# ANEXO

## ANEXO I

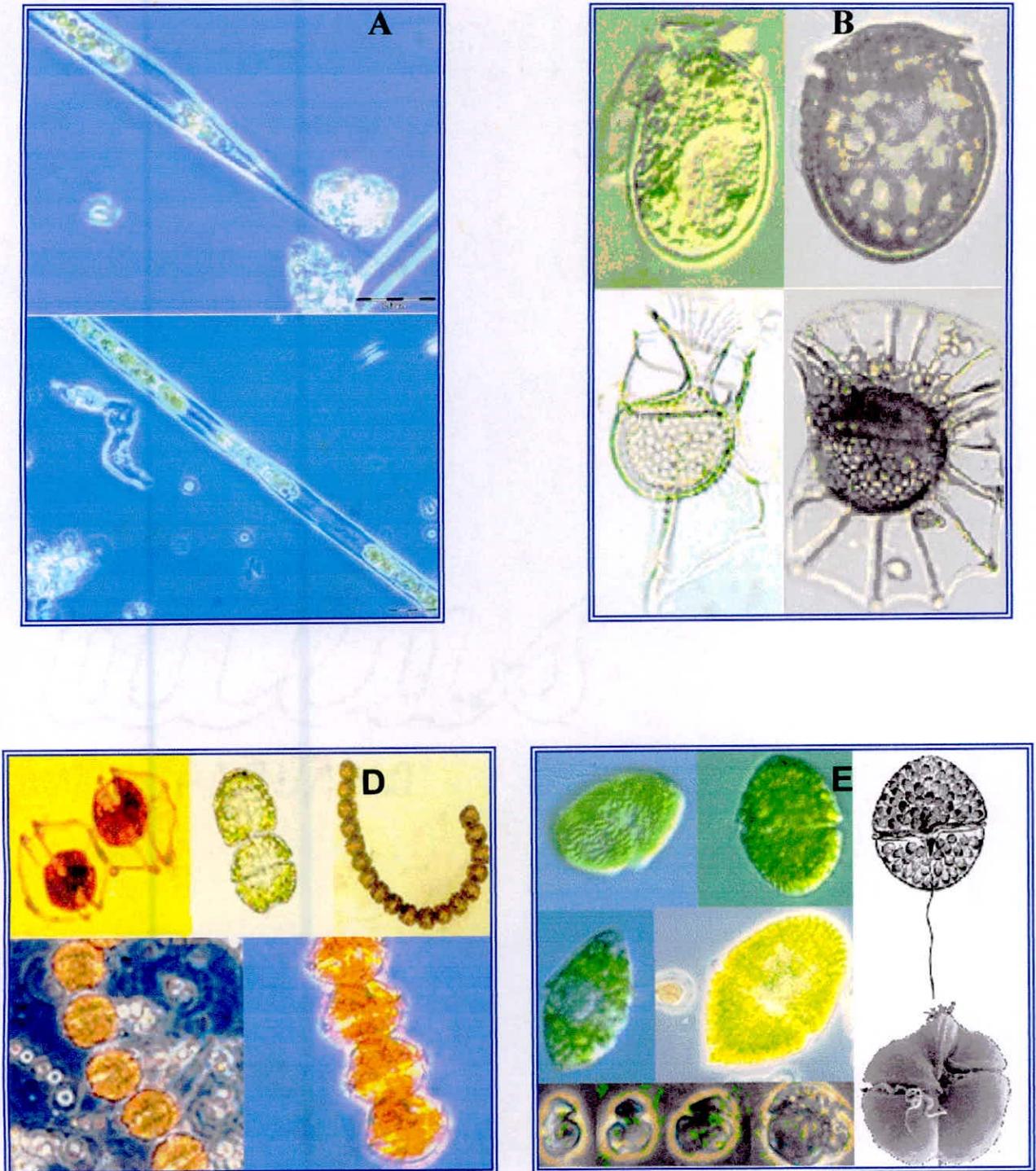


Fig. 23. Los géneros más representativos de las microalgas que causan daño en la salud humana y la maricultura A) *Pseudonitzschia* sp., causantes de la ASP. B) *Dinophysis* sp., causantes de la DSP. C) *Alexandrium* sp., causante de la PSP. D) *Karenia* sp. y *Gymnodinium* sp., causantes de la PSP.

## ANEXO II

### METODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE VENENO PARALIZANTE DE MARISCOS - PSP (AOAC, 1995)

#### 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente ensayo es aplicable a los análisis de toxinas PSP en moluscos y tiene carácter cuantitativo, permitiendo la cuantificación de las toxinas en las muestras analizadas. El límite de detección depende de la cepa de ratones utilizada, oscilando usualmente entre 32 y 48  $\mu\text{g}$  STX eq.  $\cdot$  100  $\text{g}^{-1}$  de carne.

#### 2. PRINCIPIO

El bioensayo en ratón permite la determinación de la toxicidad global producida por las toxinas PSP (PST) presentes en la muestra. El bioensayo se basa en el efecto tóxico causado por un extracto ácido de la muestra analítica, inoculado intraperitonealmente en ratones albinos de aproximadamente 20 g de peso. Las PST se extraen en caliente mediante una maceración acuosa en medio ácido de toda la carne del bivalvo previamente triturada. Posteriormente se inyecta 1 ml de extracto a cada uno de 3 ratones y se registra el tiempo de muerte ( $T_m$ ). Con los datos del peso del ratón, dilución del extracto y tiempo transcurrido hasta su muerte se calcula la toxicidad en unidades ratón (UR). Se define la UR como la cantidad de toxina que produce la muerte de un ratón de 20 g en 15 min. Con ayuda de las tablas de Sommer y del factor de conversión (FC) se transforman en  $\mu\text{g}$  de equivalentes de STX por 100 g de molusco ( $\mu\text{g}$  STX eq. 100  $\text{g}^{-1}$  de carne).

Precaución: Utilizar guantes de goma cuando se manipulen materiales que puedan contener PST.

#### 3. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tamiz de acero inoxidable
- Papel de filtro o secante
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades
- Probetas de 100 y 250 ml
- Pipetas de diferentes capacidades
- Espátulas
- Varillas de vidrio
- Tubos de vidrio con capacidad mínima de 10 ml
- Triturador-Homogeneizador
- Balanzas
- Placa calefactora

- Centrífuga
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Papel indicador de pH
- Cronómetro

#### 4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Utilizar ratones de un peso preferentemente de 19-21 g procedentes de una colonia controlada. Si el peso es menor o mayor de 20 g, aplicar el factor de corrección correspondiente para obtener las UR corregidas (URC). No utilizar ratones con un peso superior a 23 g. No reutilizar los ratones.

#### 5. REACTIVOS

- Solución patrón estándar de STX (La FDA de EE UU suministra sin costes patrón de STX de concentración 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
- Solución patrón de trabajo de STX de 1  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ : en el caso de utilizar el patrón de la FDA, diluir 1 ml de la solución patrón estándar en 100 ml de agua destilada. Esta solución es estable durante varias semanas a 3-4°C
- Ácido clorhídrico (ClH) 0.1 N
- Ácido clorhídrico (ClH) 5 N
- Agua acidulada con ClH (pH aprox. 3)
- Hidróxido sódico (NaOH) 0.1 N

#### 6. MÉTODO DE ENSAYO

##### 6.1. Estandarización del bioensayo: cálculo del factor de conversión (FC)

Diluir alícuotas de 10 ml de la solución patrón de trabajo de 1  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  con 10, 15, 20, 25 y 30 ml de agua acidulada. Inocular intraperitonealmente dosis de 1 ml de las diferentes diluciones hasta encontrar aquella que inyectada a unos pocos ratones produzca una mediana de  $T_m$  entre 5 y 7 min. El pH de las diluciones deberá estar comprendido entre 2 y 4, y no será superior a 4.5. Adicionalmente, ensayar diluciones que se diferencien en 1 ml de agua destilada de la dilución que proporcionó un  $T_m$  entre 5 y 7 min. Eji. si 10 ml de la solución de trabajo diluidos con 25 ml de agua proporcionan  $T_m$  de 5-7 min, ensayar las diluciones 10+24 y 10+26. Inocular grupos de 10 ratones con cada una de las 2, o preferiblemente 3 diluciones que produzcan una mediana de  $T_m$  entre 5 y 7 min. Inocular dosis de 1 ml a cada ratón y determinar el  $T_m$  como el tiempo transcurrido desde la finalización de la inoculación hasta la última respiración (bo-

queada) del ratón. Repetir el ensayo uno o dos días después, utilizando las diluciones anteriormente preparadas, incluyendo las que difieren en  $\pm 1$  ml de agua destilada. Posteriormente repetir el ensayo completo con diluciones preparadas a partir de una nueva solución patrón de trabajo. Calcular la mediana del  $T_m$  para cada grupo de 10 ratones utilizados con cada dilución. Si todos los grupos de 10 ratones inoculados con cualquier dilución dieran medianas de  $T_m < 5$  ó  $> 7$  min., descartar los resultados de esta dilución en los cálculos posteriores. Por otra parte, si cualquiera de los grupos de 10 ratones inoculados con una dilución dieran una mediana de  $T_m$  comprendido entre 5 y 7 min., incluir todos los grupos de 10 ratones utilizados en esa dilución, aunque alguno de los  $T_m$  pueda ser  $< 5$  ó  $> 7$  min. A partir de la mediana del  $T_m$  de cada grupo de 10 ratones para cada una de las diluciones seleccionadas, determinar el número de UR  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> utilizando la tabla de Sommer que se adjunta en este Anexo. Dividir los  $\mu$ g de STX  $\cdot$  1 ml<sup>-1</sup> calculados por las UR  $\cdot$  1 ml<sup>-1</sup> para obtener el FC, que expresa los  $\mu$ g equivalentes de STX para una UR. Calcular el promedio de los valores FC individuales, y usar este promedio como punto de referencia para controlar los análisis rutinarios.

## 6.2. Verificación del factor de conversión en los análisis rutinarios

Comprobar periódicamente el FC: Si los análisis se realizan con una frecuencia inferior a una vez por semana, determinar el valor del FC cada día que se lleven a cabo los análisis, inoculando para ello 5 ratones con la solución patrón de trabajo apropiada. Si la frecuencia analítica es de varios días a la semana, únicamente se hará un control semanal con la dilución del patrón que proporcione una mediana de  $T_m$  comprendida entre 5 y 7 min. El valor del FC así determinado deberá contrastarse con el valor FC promedio y su diferencia con él no deberá ser superior al  $\pm 20$  % del valor FC promedio. Si no fuera así, completar el grupo de 10 ratones añadiendo 5 ratones a los 5 ya inoculados, e inocular un segundo grupo de 10 ratones con la misma dilución del patrón. Promediar el valor del FC determinado para el segundo grupo con el valor del FC del primer grupo. Tomar el valor resultante como nuevo valor de FC. Una variación  $> 20$  % representa un cambio significativo en la respuesta de los ratones al veneno, o en la técnica analítica. Cambios de este tipo requieren un cambio en el valor del FC. Los controles repetidos del valor FC generalmente proporcionan resulta-

dos consistentes dentro del rango  $\pm 20$  %. Si se encontraran con frecuencia variaciones más amplias, debería investigarse la posibilidad de que existan variables no controladas o no reconocidas antes de proceder a los análisis en rutina.

## 6.3. Preparación de la muestra

*Moluscos:* Limpiar el exterior de los moluscos con agua dulce. Abrirlos cortando los músculos aductores. Enjuagar el interior con agua dulce para eliminar arena y otras sustancias extrañas. Separar la carne de la concha seccionando los músculos aductores y el tejido adherido a la charnela. No utilizar calor ni anestésicos para abrir las conchas y tener cuidado de no cortar o dañar el cuerpo de los moluscos en esta etapa. A continuación acondicionar las carnes para permitir su drenado durante 5 min. Descartar el drenado. Recoger 100-150 g de carne y proceder a su homogeneización.

*Marisco en conserva:* En este caso, en la preparación de la muestra se ha de conseguir la homogeneización de todo el contenido del envase (carne y líquido de gobierno). Para ello, triturar la carne, mezclar con el líquido de cobertura y homogeneizar en forma semejante a la descrita anteriormente. En el caso de conservas con envases de gran capacidad, separar la carne y drenar durante unos minutos, recolectando todo el líquido de gobierno. Determinar el peso de la carne y el volumen de líquido, a fin de poder recombinar posteriormente porciones de cada fracción en cantidades proporcionales. Triturar una porción de la carne con una cantidad proporcional de líquido de gobierno. Homogeneizar como se ha descrito anteriormente.

## 6.4. Extracción

Pesar 100 g del homogeneizado en un vaso de precipitados previamente tarado. Añadir 100 ml de ClH 0.1 N y agitar vigorosamente. Comprobar el pH (debe estar entre 2 y 4, preferiblemente 3). Si fuese necesario, ajustar el pH como se indicará posteriormente. Calentar el homogeneizado en placa calefactora, manteniendo en ebullición suave durante 5 min. Enfriar en baño de agua fría. Transferir el homogeneizado a una probeta graduada y enrasar hasta 200 ml. Ajustar el pH entre 2.0 y 4.0 (preferiblemente 3). Para disminuir el pH, añadir ClH 5N gota a gota y agitando; para aumentar el pH, añadir NaOH 0.1 N gota a gota y agitando continuamente para prevenir una alcalinización local y la consecuente

destrucción de la toxina. Mezclar convenientemente para homogeneizar de nuevo y dejar reposar el homogeneizado hasta que la porción líquida (sobrenadante) sea traslúcida y se pueda decantar libre de partículas sólidas lo suficientemente grandes como para atorar la aguja hipodérmica. Si fuera necesario (y preferiblemente como norma general), centrifugar el homogeneizado o el líquido sobrenadante durante 5 min a 3.000 rpm, o bien filtrar a través de papel. Sólo se necesita una pequeña cantidad de líquido sobrenadante para la realización del bioensayo.

### 6.5. Bioensayo del ratón

Inocular intraperitonealmente cada uno de los ratones utilizados en el ensayo con 1 ml del extracto ácido. Anotar el momento de la inoculación y observar los ratones cuidadosamente para estimar el  $T_m$  del ratón, que vendrá determinado por el último movimiento respiratorio (boqueada) del ratón. Utilizar un cronómetro para medir el  $T_m$ . Para una determinación inicial se puede usar un ratón, pero es preferible utilizar 2 ó 3. Si el  $T_m$  o la mediana del  $T_m$  de varios ratones es  $<5$  min, diluir el extracto hasta obtener tiempos de muerte comprendidos entre 5 y 7 min. Si es necesario realizar grandes diluciones, ajustar el pH entre 2 y 4 adicionando gota a gota CIH 0.1 N. Inocular un mínimo de tres ratones con el extracto o dilución que produce tiempos de muerte entre 5 y 7 min. Si el  $T_m$  de uno o dos ratones inoculados con el extracto no diluido de la muestra es  $>7$  min. (o hay supervivencia), debe inocularse un total de 3 ó más ratones para establecer la toxicidad de la muestra.

### 7. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD

Determinar el  $T_m$  de cada uno de los ratones utilizados en el ensayo, incluyendo, en su caso, los supervivientes. Calcular las UR correspondientes utilizando la tabla de Sommer. Considerar que el  $T_m$  de los ratones supervivientes es  $>60$  min o equivalente a 0.875 unidades ratón. Corregir las UR obtenidas para cada ratón multiplicando por el FC del peso de ese ratón obtenido en la tabla de corrección de peso que se adjunta. Después, calcular la mediana de las UR corregidas (URC) del grupo. Las URC se convierten en toxicidad PSP, expresada como  $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de carne mediante la fórmula:  $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1} = \text{URC} \times \text{FC} \times \text{factor de dilución} \times 200$

Un valor superior a  $80 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  se considera peligroso y no apto para el consumo.

Tabla de Sommer con las relaciones entre tiempos de muerte y unidades ratón (UR) para PSP.

Tiempo de muerte (min y s)	Unidades ratón (UR)	Tiempo de muerte (min y s)	Unidades ratón (UR)
1:00	100	5:00	1.92
10	66.2	05	1.89
15	38.3	10	1.86
20	26.4	15	1.83
25	20.7	20	1.80
30	16.5	30	1.74
35	13.9	40	1.69
40	11.9	45	1.67
45	10.4	50	1.64
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.60
		15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.39
20	5.66	15	1.35
25	5.32	30	1.31
30	5.00	45	1.28
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.25
45	4.26	15	1.22
50	4.06	30	1.20
55	3.88	45	1.18
3:00	3.70	9:00	1.16
05	3.57	30	1.13
10	3.43		
15	3.31	10:00	1.11
20	3.19	30	1.09
25	3.08		
30	2.98	11:00	1.075
35	2.88	30	1.06
40	2.79		
45	2.71	12:00	1.05
50	2.63		
55	2.56	13	1.03
		14	1.015
4:00	2.50	15	1.000
05	2.44	16	0.99
10	2.38	17	0.98
15	2.32	18	0.972
20	2.26	19	0.965
25	2.21	20	0.96
30	2.16	21	0.954
35	2.12	22	0.948
40	2.08	23	0.942
45	2.04	24	0.937
50	2.00	25	0.934
55	1.96	30	0.917
		40	0.898
		60	0.875

Tabla de valores de corrección según el peso de los ratones

Peso ratón (g)	Unidades ratón (UR)
10	0.50
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.70
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95
19	0.97
19.5	0.985
20	1.000
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07

## MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE VENENO DIARREICO DE LOS MARISCOS

### 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente procedimiento es aplicable a los análisis de ácido okadaico (AO) y dinofisitoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs), y yesotoxinas (YTXs) en moluscos bivalvos. El límite de detección es 0.8 µg de AO eq. · g<sup>-1</sup> hepatopáncreas.

### 2. PRINCIPIO

El AO y derivados, las PTXs y las YTXs son sustancias polietéreas liposolubles extraíbles con acetona. El bioensayo en ratón de Yasumoto *et al.* (1978) permite su detección conjunta, proporcionando una única respuesta a todas las sustancias activas de la muestra. Este bioensayo se basa en el efecto tóxico agudo causado por un extracto acetónico de la muestra analítica, evaporado y redissuelto en una solución acuosa de Tween 60. Este extracto se inocula intraperitonealmente en ratones albinos de aprox. 20 g

de peso. La determinación de la toxicidad se realiza en función del *T<sub>m</sub>* de los ratones inoculados con 1 ml del extracto de Tween.

### 3. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tijeras
- Tamiz de acero inoxidable
- Papel de filtro o secante
- Homogeneizador eléctrico ó Ultraturax
- Balanzas
- Rotavapor
- Filtros de papel
- Baño de agua termostaticado
- Agitador magnético
- Matraces colectores adaptables al rotavapor
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Material diverso de uso en laboratorio

### 4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Swiss, preferentemente entre 19 y 21 g.

### 5. REACTIVOS

- Acetona P.A.
- Eter dietílico P.A.
- Agua destilada
- Solución de Tween 60 al 1% en agua destilada

### 6. METODO DE ENSAYO

#### 6.1. Preparación

Lavar los moluscos con agua dulce. Abrir los bivalvos con un cuchillo seccionando el músculo aductor, cuidando de no cortar o dañar el cuerpo. Enjuagar el interior con agua dulce para eliminar arenas o sustancias extrañas. Disecar perfectamente los hepatopáncreas (HP), procurando eliminar todas las porciones del manto adheridas a éstos y depositarlos sobre un tamiz de acero inoxidable para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Posteriormente, colocar los HP en un papel de filtro y dejar secar. Homogeneizar aprox. 30 g de HP con ayuda del Ultraturax. En el caso de moluscos con HP de gran tamaño, se tomarán los HP procedentes de al menos 10-12 individuos.

#### 6.2. Extracción

Pesar 25 g del homogeneizado de HP en un vaso de precipitados previamente tarado. Añadir 50 ml de acetona y homogeneizar con Ultraturax o similar durante 2-3 min.. Dejar sedimentar la fase sólida.

Filtrar el sobrenadante a través de papel de filtro, recogiéndolo en un matraz colector adaptable al rotavapor. Repetir los mismo pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 ml de acetona en cada ocasión. Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector.

Evaporar a sequedad el extracto acetónico en rotavapor, con el baño de agua a una temperatura de aproximadamente 40 °C (nunca superior a 45 °C). Redisolver el residuo con una solución acuosa de Tween 60 al 1%, previamente atemperada a 40 °C de tal forma que el volumen final de inóculo sea aproximadamente 5 ml. La relación peso/volumen a obtener será de aproximadamente 5 g de HP iniciales por ml de solución acuosa de Tween 60 al 1%.

### 6.3. Bioensayo en ratón

Inocular por vía intraperitoneal 3 ratones de aprox. 20 g con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Anotar la hora de inoculación. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas. En el caso de observar en los ratones una sintomatología que pudiera indicar interferencias de biotoxinas PSP o ASP se seguirá el procedimiento alternativo que se expone al final del anexo.

## 7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones inyectados en un período menor o igual a 24 horas después de la inyección.

### PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO PARA ELIMINAR INTERFERENCIAS CON TOXINAS PSP O ASP

En el caso de observar síntomas de PSP o ASP en los ratones, se seguirá el procedimiento de Yasumoto *et al.* (1984) que se describe a continuación. Los apartados 3, 4, 5 y 6.1 relativos a aparatos y material, animales de experimentación, reactivos y preparación de la muestra del protocolo anterior son de aplicación en el protocolo alternativo.

## 1. METODO DE ENSAYO

### 1.1. Extracción

Pesar 25 g del homogeneizado de HP en un vaso de precipitados previamente tarado. Añadir 50 ml de

acetona y homogeneizar con Ultraturax o similar durante 2-3 min. Dejar sedimentar la fase sólida. Filtrar el sobrenadante a través de papel de filtro, recogiéndolo en un matraz colector adaptable al rotavapor. Repetir los mismos pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 ml de acetona en cada ocasión. Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector. Evaporar el extracto acetónico final en rotavapor, con el baño de agua a aprox. 40 °C (nunca > 45 °C). No es necesario evaporar totalmente el agua residual. Añadir al extracto residual un pequeño volumen de agua de manera que el volumen final de extracto sea aprox. 15 ml. Trasvasar el extracto a un embudo de decantación. Arrastrar los restos del residuo que pudieran permanecer en el matraz colector con 50 ml de éter dietílico y combinar este extracto etéreo con el extracto acuoso en el embudo de decantación. Agitar suavemente invirtiendo varias veces el embudo (evitar agitación vigorosa para prevenir la formación de emulsiones). Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases. Separar la fracción acuosa y reservar la fracción etérea. Extraer la fracción acuosa dos veces más con 50 ml de éter dietílico. Combinar las fracciones etéreas y realizar dos lavados adicionales del extracto etéreo con 15 ml de agua. Descartar las fracciones acuosas y evaporar el extracto etéreo a sequedad. Redisolver el residuo con una solución acuosa de Tween 60 al 1%, previamente atemperada a aprox. 40 °C de tal forma que el volumen final de inóculo sea 5 ml. La relación P/V a obtener será de 5 g de HP por cada ml de Tween 60 al 1%.

### 1.2. Bioensayo en ratón

Inocular por vía intraperitoneal 3 ratones de aprox. 20 g de peso con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Anotar la hora de inoculación. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas.

## 2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones inyectados en un período menor o igual a 24 horas tras la inyección.

Nota: La sustitución del éter dietílico por diclorometano mejora la extractabilidad de las Yesotoxinas.

# MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE ACIDO OKADAICO, DINOFISISTOXINAS, PECTENOTOXINAS, YESOTOXINAS Y AZASPIRÁCIDOS EN EL CUERPO ENTERO DE LOS MOLUSCOS

(Yasumoto et al., en prep.)

## 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente procedimiento es de aplicación a los análisis de Acido okadaico (AO), Dinofisistoxinas (DTXs), Pectenotoxinas (PTXs), Yesotoxinas (YTXs) y Azaspirácidos (AZAs) en moluscos bivalvos. El presente ensayo permite la determinación sobre el cuerpo entero de los moluscos de la presencia o ausencia de estas toxinas a los niveles establecidos en la Decisión 2002/225/CEE del 15 de Marzo de 2002.

## 2. PRINCIPIO

El AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs son sustancias bioactivas polietéreas producidas por diferentes especies de dinoflagelados. Todos estos compuestos son extraíbles con acetona, si bien la extracción cuantitativa de los AZAs requiere una segunda extracción con metanol. El presente ensayo está basado en el bioensayo en ratón de Yasumoto (1984), que ha sido modificado de manera que permita el análisis del cuerpo entero del molusco y la detección conjunta de las sustancias contempladas en la Decisión 2002/225/CEE a los niveles establecidos en la misma. El bioensayo en ratón se basa en el efecto tóxico agudo causado por un extracto acetónico/metanólico de la muestra analítica (homogeneizado de la carne de los moluscos) purificado a través de partición líquido/líquido y posteriormente evaporado y resuspendido en una solución acuosa de Tween 60 al 1 %. Este extracto es inoculado intraperitonealmente en ratones albinos de aproximadamente 20 g de peso. La determinación de la toxicidad se realiza en función del tiempo de muerte de los ratones inoculados con 1 ml del extracto de Tween.

## 3. REACTIVOS

- Acetona
- Metanol
- Solvente\* para la partición líquido/líquido: éter dietílico ó acetato de etilo o diclorometano
- Butanol
- Agua destilada
- Solución de Tween 60 al 1% en agua destilada

\* Nota: El diclorometano y el acetato de etilo son equivalentes en lo que se refiere a extractabilidad de las toxinas reguladas en la Decisión 2002/225/CEE, de manera que AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs son extraídas cuantitativamente con ambos solventes. Sin embargo, el uso en rutina del acetato de etilo puede presentar inconvenientes debido a la emulsión formada durante la partición con agua. El diclorometano no presenta este problema, si bien su elevada toxicidad y las regulaciones establecidas en algunos países contra el uso de solventes clorinados, pudieran dificultar su aplicación en rutina. La eficacia del éter dietílico en cuanto a la extracción de las YTXs no es tan alta como en el caso de la extracción de AO, DTXs, PTXs y AZAs (alrededor de un 50 % de las YTXs presentes pueden pasar a la fase acuosa). Sin embargo, debido a la alta sensibilidad del ratón a la presencia de YTXs, se puede considerar este solvente como adecuado para detectar la presencia de YTXs a concentraciones muy por debajo del límite establecido en la Decisión, y por tanto, puede ser utilizado con fines de control. Los tres solventes propuestos para la partición líquido/líquido pueden ser considerados equivalentes en términos de protección de la Salud Pública.

## 4. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tamiz de acero inoxidable.
- Homogeneizador eléctrico o Ultraturrax.
- Balanzas
- Filtros de papel
- Rotavapor
- Baño de agua termostaticado
- Matraces colectores adaptables al rotavapor de diferentes volúmenes
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Bomba de vacío regulable
- Matraces Erlenmeyer Kitasato
- Embudos de decantación
- Embudo Buchner o similar
- Material diverso de uso en laboratorio

## 5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Swiss, preferentemente de peso  $20 \pm 1$  g.

## 6. MÉTODO DE ENSAYO

### 6.1. Preparación

Limpiar externamente los moluscos con agua dulce. Con ayuda de un cuchillo abrir los bivalvos

seccionando el músculo aductor, cuidando de no cortar o dañar el cuerpo de los bivalvos. Si fuera necesario, enjuagar el interior con agua dulce para eliminar arenas o sustancias extrañas. Separar la carne de la concha seccionando los músculos aductores y el tejido adherido a la charnela. Depositar la vianda en un tamiz de acero inoxidable y escurrirla el tiempo necesario para eliminar la mayor cantidad de agua. Recoger entre 100 y 150 g de vianda y proceder a su homogeneización.

## 6.2. Extracción

Pesar 100 g del homogeneizado de carne del molusco en un vaso de precipitados. Añadir 300 ml de acetona y homogeneizar durante 2 min. Filtrar a presión reducida y reservar el filtrado. Extraer el residuo con 300 ml de metanol, homogeneizando durante dos minutos. Filtrar este segundo extracto a presión reducida. Combinar los extractos acetónico y metanólico en un matraz colector adaptable a rotavapor, preferentemente de 2 litros. Añadir 20-25 ml butanol (nunca más de 50 ml) para prevenir la formación de espumas.

Evaporar hasta casi sequedad (la temperatura del baño de agua no debe exceder los 45°C) y transferir el residuo con 100 ml del solvente seleccionado para la partición a un embudo de decantación. Añadir al embudo 50 ml de agua y agitar suavemente invirtiendo varias veces el matraz (evitar agitación vigorosa). Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases. Reservar la fase orgánica y recoger la fase acuosa llevándola a otro embudo de decantación. Lavar la fase acuosa con 20 ml adicionales de solvente orgánico.

Dejar en reposo para separar las dos fases. Descartar la fase acuosa y combinar las fases orgánicas. Transferir el extracto combinado a un matraz colector adaptable al rotavapor y evaporar hasta sequedad. No obstante como, dependiendo del tipo de muestras, la resuspensión del residuo final en Tween 60 al 1 % para la posterior inoculación a los ratones pudiera resultar difícil, el residuo obtenido tras la evaporación del solvente orgánico se reextrae mediante sonicación con 16 ml de metanol. Tras unos minutos de reposo, separar el sobrenadante que contiene las toxinas del residuo que permanece en el fondo.

Evaporar a sequedad el extracto metanólico y resuspenderlo en Tween 60 al 1 %, transfiriéndolo a un tubo graduado de manera que el volumen final

sea de 4 ml. La relación peso/volumen a obtener es de 25 g de carne iniciales por cada ml de solución acuosa de Tween 60 al 1%.

## 6.3. Bioensayo en ratón

Inocular por vía intraperitoneal tres ratones de aproximadamente 20 g de peso con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas.

## 7. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La muerte de 2 de 3 ratones en 24 horas podría ser interpretada como la presencia de una o más toxinas liposolubles (AO y DTXs, PTXs, YTXs y AZAs) a niveles superiores a los establecidos en la Decisión 2002/225/CEE del 15 de Marzo de 2002. Aunque esta asunción es correcta en el caso de toxinas de los grupos del AO, DTXs, PTXs y AZAs, si hay YTXs en las muestras a analizar se pueden producir resultados positivos incluso si estas sustancias se encuentran a niveles muy por debajo del nivel regulatorio de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $160 \text{ } \mu\text{g}$  equiv.  $\text{YTX} \cdot \text{kg}^{-1}$  pueden producir la muerte en los ratones).

Se puede sospechar la presencia de YTXs o su co-ocurrencia con las otras toxinas del grupo si los ratones mueren antes de 6 h con síntomas similares a los producidos por las toxinas PSP (convulsiones y saltos), aunque este tipo de muerte puede ser también ocasionado por la presencia de niveles elevados de algunas toxinas de los otros grupos regulados en la Decisión. En este caso, se recomienda la aplicación del protocolo que se describe seguidamente y que contempla una partición líquido/líquido con diclorometano/metanol 60 % y que permite la determinación de AO, DTXs, PTXs y AZAs en el extracto de diclorometano y la determinación de las YTXs en la fase metanólica.

Si los ratones mueren entre las 6 y 24 horas, es muy improbable que las YTXs estén presentes en las muestras, o bien que contribuyan a su toxicidad de forma significativa, de manera que este resultado se puede interpretar como la presencia de una o más toxinas de los siguientes grupos: OA, DTXs, PTXs y AZAs a niveles superiores a los establecidos en la decisión 2002/225/CEE.