



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC PARA LA
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMÓICO IMPLICADO EN LA
INTOXICACIÓN AMNÉSICA POR LA INGESTA DE MOLUSCOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A
HAIDE LOZANO BECERRIL



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** BERNARDO LUCAS FLORENTINO

VOCAL: **Profesor:** PEDRO VALLE VEGA

SECRETARIO: **Profesor:** JORGE ALEJANDRO FLORES MALDONADO

1er. SUPLENTE: **Profesor:** LETICIA GIL VIEYRA

2° SUPLENTE: **Profesor:** ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 4A, EDIFICIO A Y LABORATORIO 111, CONJUNTO E,

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

M.en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. CASIMIRO RAMÍREZ CAMARENA

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

HAIDE LOZANO BECERRIL

(nombre y firma)



A mi familia

(Ma. Guadalupe, Reynaldo,

Norma y Omar)

A G R A D E C I M I E N T O S

*A mis padres **Ma. Guadalupe y Reynaldo**, y mis hermanos **Norma y Omar**, quienes siempre me han otorgado su apoyo incondicional y que sin su ayuda no habría sido fácil concluir esta tarea.*

*A la **Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México**, quién me ha otorgado una educación profesional de calidad, además de toda la infraestructura necesaria para llevar a cabo el proyecto experimental.*

*Al **M. en C. Bernardo Lucas Florentino**, mi asesor de Tesis, quién me dio la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, me transmitió parte de su conocimiento, me proporcionó los recursos necesarios y me dedicó todo el tiempo necesario para concluir de forma satisfactoria este proyecto.*

*Al **QFB Casimiro Ramírez Camarena**, Investigador del Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA), quién fue asesor Técnico en el desarrollo de este trabajo experimental y que sin duda sin su colaboración no hubiera sido posible llevarlo a cabo.*

*Al **Ing. Alejandro Flores Maldonado** y al **Dr. Pedro Valle Vega**, por todo el tiempo invertido en este trabajo de Tesis, por apoyarme en cada parte del proceso para hacer posible la impresión de esta versión final.*

*Al **Dr. Ernesto García-Méndoza**, Investigador del CICESE y al mismo **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)** por las facilidades otorgadas al enviar las muestras positivas e información de las mismas, para la elaboración de este proyecto.*

Al QFB Agustín Reyo Herrera por las facilidades para utilizar las instalaciones del laboratorio 4-A y el equipo para HPLC.

*A el resto de mi familia, mis abuelos (**Marina y Beto**), tíos (**Trinidad, Guillermina, Pablo, Orlando, Angélica**), primos (**José, Tere, Pablo, Ave, Hugo y Adriana**) y sobrinos, quienes de una u otra forma siempre me han apoyado en lo que he necesitado, en mis decisiones y que han estado presentes durante toda mi formación hasta el momento.*

*A mis Amigos (**Myrna, Jenn, Vero, Carlos, Diana, Francisco** y todos aquellos que estuvieron conmigo en algún momento a mi lado) por el apoyo dentro y fuera de las aulas, por su compañía, por ser parte de mi formación y ayudarme a seguir adelante.*

A Christian Ramírez, quién ha estado a mi lado durante por un largo lapso en mi vida, que ha estado conmigo en los buenos y malos momentos y, que siempre me ha apoyado para seguir adelante.

*A todos los **integrantes del laboratorio 111**, quienes tras cualquier duda estuvieron siempre disponibles para proporcionarme información.*

*A todos los **profesores** que a lo largo de mi vida han contribuido en mayor o menor medida a mi formación académica.*

ÍNDICE

CAPITULO I

1.1 Introducción.	5
1.2 Objetivos	7
1.2.1 Objetivos Generales:	7
1.2.2 Objetivos Específicos:	8

CAPITULO II

2. Marco Teórico	10
2.1. Mareas Rojas	10
2.2 Propiedades Físicas y Químicas del Ácido Domóico (DA)	12
2.3 Origen del ácido domóico y hábitat de las especies productoras.	14
2.3.1 Fuente de producción del DA	14
2.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento de <i>Pseudonizschia spp</i>	15
2.3.3 Hábitat de las microalgas productoras de DA	18
2.4 Absorción y eliminación de DA en organismos acuáticos.	19
2.5 Técnicas de análisis para el ácido domóico	21
2.5.1 Métodos químicos	21
2.5.1.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	22

2.6 Toxicología del DA	25
2.6.1 Modo de acción del DA	25
2.6.2 Síntomas Clínicos de la ASP	26
2.6.3. Toxicidad del DA en organismos marinos	27

CAPITULO III

3. Metodología	30
3.1 Diagrama general de trabajo.	30
3.2 Cuantificación de DA por HPLC	
3.2.1 Fundamento:	31
3.2.2 Material y Equipo:	32
3.2.3 Preparación de la fase móvil	33
3.2.4 Elaboración de una disolución de triptofano.	33
3.2.5 Preparación de los estándares de DA.	33
3.2.6 Extracción de DA a partir de las muestras de animales acuáticos (Moluscos bivalvos, peces)	34
3.2.7 Preparación de la muestra para la determinación del porcentaje de recuperación de la metodología.	35
3.2.8 Cuantificación por HPLC y determinación de tiempo de retención.	35

CAPITULO IV

4. Resultados y Discusión	38
4.1 Determinación del tiempo de retención del triptofano por HPLC.	38
4.2 Determinación del tiempo de retención del ácido domóico.	39
4.3 Verificación de la linealidad para diferentes concentraciones del ácido domóico y precisión en la determinación.	40
4.4 Verificación de la Reproducibilidad de las determinaciones.	43
4.5 Verificación de no interferencia con el DA.	45
4.6 Determinación del porcentaje de recuperación del DA.	48
4.7 Cuantificación de DA en muestras positivas.	51
4.7.1 Cuantificación de DA en la muestra SQA2	54
4.7.2 Cuantificación de DA en la muestra A1	57
4.7.3 Cuantificación de DA en la muestra A2	58
4.7.4 Comparación de resultados	59
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	64
APÉNDICE	68



CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN.

El incremento de fertilizantes en las aguas costeras, provocado por las descargas de desechos agrícolas, industriales y urbanos, mas el calentamiento global de la tierra, son condiciones que probablemente están favoreciendo la proliferación de algas dañinas para la salud publica y ambiental (Hallegraeff, 1993). Entre las microalgas predominantes en el fitoplancton marino están el grupo de las **diatomeas**, dentro de las cuales se encuentran las especies del género *Pseudonitzschia spp*, que están relacionadas con la producción de sustancias tóxicas como el **Ácido domóico** (Pérez, 2002).

El **Ácido domóico (DA = Domoic Acid)** es una excitotoxina implicada en la Intoxicación Amnésica por Moluscos (**ASP = Amnesic Shellfish Poisoning**), ya que interfiere con los sistemas de neurotransmisión del cerebro, afectando a nivel del hipocampo. Existen reportes que indican que esta neurotóxina puede acumularse en moluscos bivalvos, peces y crustáceos.

Se han reportado casos de intoxicación por DA tanto en el hombre como en organismos marinos en varios países del mundo, entre ellos EUA, México, España y Canadá. En el último país se presentó la única intoxicación en humanos por la ingesta de moluscos contaminados, donde las personas intoxicadas reportaron síntomas como vómito, dolor abdominal, diarrea, vértigo, desorientación, confusión, amnesia, coma y hasta la muerte (Botana, 2000).

El establecimiento de una metodología para la cuantificación de DA es importante debido a que México cuenta con un mercado potencial para la exportación de moluscos bivalvos. Sin embargo, por la escasa difusión y el elevado costo de la técnica analítica, existen pocas instituciones en México capaces de realizar este análisis, lo cual podría estar limitando las exportaciones de estos recursos marinos.

Existen metodologías químicas (HPLC, electroforesis capilar, cromatografía de capa fina y espectrometría de masas) y biológicas (bioensayos en ratones y monos, cultivos neuronales, etc.) para la determinación y cuantificación de DA, sin embargo, este trabajo se enfocará en la metodología oficial establecida por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos de EUA (AOAC, 2000), en donde la cuantificación se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Botana, 2000).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVOS GENERALES:

- ~ Desarrollar e implementar el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de Ácido domóico, establecido como método oficial en el AOAC.
- ~ En la Facultad de Química, UNAM, corroborar los parámetros más relevantes para validar la metodología por HPLC para la cuantificación de ácido domóico.
- ~ Una vez establecida la metodología, cuantificar la cantidad de ácido domóico presente en muestras contaminadas proporcionadas por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ~ Manipular y adiestrarse en el correcto funcionamiento de un equipo para Cromatografía líquida de Alta Resolución.
- ~ Obtener el tiempo de retención y reproducibilidad del triptofano, que es factible que interfiera en la cuantificación con el ácido domóico.
- ~ Adecuar la infraestructura con la que se cuenta para llevar a cabo la validación de la metodología.
- ~ Determinar el tiempo de retención y precisión en la determinación de ácido domóico.
- ~ Obtener una relación entre concentración y área bajo la curva del ácido domóico, para verificar el intervalo lineal, y la posterior cuantificación de la toxina.
- ~ Verificar que en la obtención de un homogenado del material biológico sin ácido domóico, no se presente interferencia para su cuantificación.
- ~ Determinar el porcentaje de recuperación de ácido domóico obtenido mediante la metodología establecida.
- ~ Determinar el contenido de ácido domóico en muestras sospechosas de su presencia.



CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Mareas Rojas

Las mareas rojas son fenómenos del ambiente marino, ocasionados por una elevada concentración de microalgas, lo cual permite que se observen como manchas de diversos colores. Actualmente, a estos eventos se les designa como Florecimientos Algales Nocivos (FAN) debido a que ocasionan una gran diversidad de impactos como mortandades de peces, crustáceos, moluscos, mamíferos, aves marinos, y en algunas ocasiones llegan a afectar a la salud pública a través de la cadena alimenticia.

El desarrollo más frecuente de FAN en las aguas costeras, se ha visto favorecido principalmente por incremento de fertilizantes provenientes de actividades humanas, como son la descarga de aguas de desechos agrícolas, industriales y urbanas; la deforestación porque permite mayores escurrimientos que arrastran fertilizantes, tóxicos y minerales hacia la costa; la deforestación de los manglares porque reduce su capacidad de absorción de nutrientes; la proliferación de la acuicultura porque produce una gran cantidad de materia orgánica de desecho y además utiliza fertilizantes para incrementar la abundancia de microalgas. Otros factores que también están favoreciendo estas proliferaciones algales son el calentamiento de la superficie marina por el cambio climático global, los vientos debido a que forman surgencias en las costas y el desplazamiento de las corrientes marinas de diferente densidad y temperatura (Hallegraeff, 1993).

Los FAN's pueden provocar esta variedad de efectos negativos principalmente por tres mecanismos principalmente: Las densidades muy elevadas de microalgas o fitoplancton producen grandes cantidades de materia orgánica de desecho, que para su oxidación requiere oxígeno disuelto, y en combinación con una alta tasa de respiración nocturna, llega a agotar el oxígeno disuelto del agua provocando las mortandades de peces y otros organismos marinos. Algunas especies de microalgas desarrollan espinas y estructuras agudas, las cuales dañan las branquias de los peces, impidiéndoles respirar. Y también porque algunas especies del fitoplancton tienen la capacidad de producir sustancias neurotóxicas que pueden ser bioacumuladas en diferentes niveles tróficos y afectar al hombre cuando ingiere alimentos marinos contaminados provocándole diferentes síndromes por intoxicación alimentaria (Hallegraeff, 1993).

El fitoplancton marino consta de diversos grupos de microalgas como son las diatomeas, dinoflagelados, fitoflagelados, rafidofitas y cianobacterias. El grupo más abundante son las diatomeas que se caracterizan por poseer una cubierta de sílice transparente y presentan una gran diversidad de formas y estructuras, entre las especies de este grupo sobresale el género ***Pseudo-nitzschia***, debido a que tiene la propiedad de producir Ácido Domóico (DA = Domoic Acid), la cual es una potente neurotoxina que le ocasiona al hombre una intoxicación alimentaria denominada Intoxicación Amnésica por Moluscos (ASP = Amnesic Shellfish Poison), debido a que su principal signo es la pérdida de memoria de corta duración, que ocurre mientras que las personas se encuentran intoxicadas, y un porcentaje de 3.7% puede llegar a morir con dosis elevadas de DA (Cortés, 1998).

2.2 Propiedades físicas y químicas del Ácido domóico (DA)

El DA es un aminoácido secundario, el cual pertenece a los aminoácidos denominados canoicos. El nombre químico del ácido domóico es **Ácido (2S,3S,4S)-2-carboxi-4-1-metil-5(R)-carboxil-1(Z),3(E)-hexadienil pirrolidin-3- acético** y su fórmula condensada es $C_{15}H_{21}NO_6$.

El DA dentro de su estructura química (figura 1) contiene 3 ácidos carboxílicos como lo indica su nombre, lo cual es importante para su acción como neurotoxina (Botana, 2000).

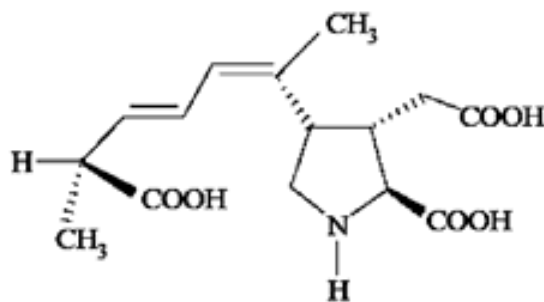


Figura 1. Estructura química del DA

Las propiedades físico-químicas del ácido domóico se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades Físico-Químicas del ácido domóico (Wright y Quilliam, 1995).

Punto de fusión	Peso molecular	UV (Máxima absorción)	Bandas características IR (película)
215-216 °C	311.14 g/mol	242nm	3500-2500, 1715, 1400, 1215, 966 cm^{-1}

El DA es un amino ácido cristalino, soluble en agua. Puede purificarse por diversos métodos cromatográficos y su detección se facilita por espectroscopia UV por poseer un grupo cromóforo fuerte (FAO, 2004). Este compuesto absorbe a 242 nm en el rango del ultravioleta, lo que facilita su identificación y cuantificación (Cortés, 1998).

Originalmente, el DA fue descubierto como un producto de una macroalga roja, *Chondria armata*, y aislado posteriormente de otras microalgas rojas.

Existen cinco isómeros geométricos de ácido domóico (A, B, C, D, E y F) y un diasterómero C5' (figura 2), sin embargo, los isómeros D, E y F además del diasterómero C5' son los que se han encontrado en extractos del plancton o en tejidos de peces y moluscos analizados (Wright, *et al.*, 1990; Walter *et al.*, 1994). Los estudios farmacológicos indican que estos estereoisómeros se unen menos fuertemente con las proteínas receptoras del kainato que el propio DA, sugiriendo que no son tan tóxicas como el aminoácido precursor (Wright y Quilliam, 1995).

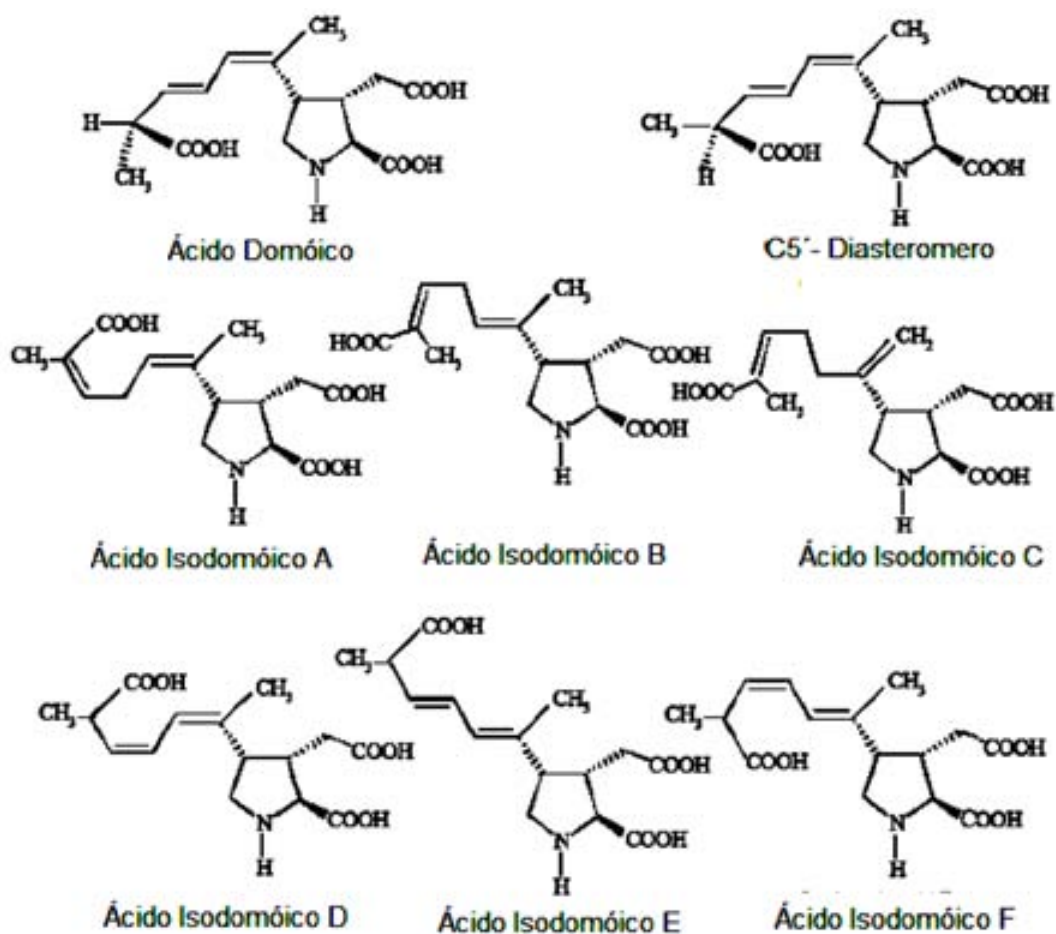


Figura 2. Estructura química del ácido Domóico y sus isómeros (FAO, 2004).

2.3 Origen del ácido domóico y hábitat de las especies productoras.

2.3.1 Fuente de producción del DA

El ácido domóico fue extraído por primera vez a partir de una macroalga llamada *Chondria armata* en Japón (Pérez, 2002). En 1987 cuando se presentó un caso de envenenamiento en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá por la ingesta de mejillones contaminados con ácido domóico, se considero a *Pseudonitzschia pungens f. multiseriis* como la fuente responsable de esta biotoxina. En cultivos a nivel laboratorio se encontró que esta microalga produjo ácido domóico en niveles de 1 a 20 pg/célula (Subba Rao et al., 1988; Bates et al., 1989). El ácido domóico se encontró presente en niveles de hasta 1000 µg/g de tejido analizado. Este fue el primer reporte de ácido domóico como una toxina marina (Wright y Quilliam, 1995).

A las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* se les confiere la producción de ácido domóico, las cuales pueden ser abundantes y algunas veces dominan el fitoplancton marino. Estas diatomeas no han sido identificadas formando florecimientos masivos en aguas mexicanas, y menos en envenenamientos por ASP; sin embargo, esto no quiere decir que no existan o se hayan presentado, por su difícil identificación es posible que hayan pasado desapercibidas. En las costas del océano Pacífico se ha registrado a *Pseudonitzschia pungens* y *Pseudonitzschia seriata* y en el Golfo de México a *Pseudonitzschia pungens*, *Pseudonitzschia seriata* y *Pseudonitzschia delicatissima*. Actualmente todo el grupo de *Pseudonitzschia* está sujeto a revisión profunda sobre todo por su producción de toxinas (Cortés, 1998).

Work, demostró la presencia de ácido domóico en contenidos estomacales de pelícanos intoxicados en la bahía de Monterrey Bay, California, EUA, en Septiembre de 1991, además determinó los niveles de ácido domóico presente en los peces que constituían el alimento de las aves, detectando así altos niveles en anchoas, hasta de 100 µg/g, principalmente en sus contenidos estomacales en los que se encontraron abundantes microalgas del género *Pseudonitzschia spp*, responsable de la producción de la toxina (Cortés, 1998). Entre las especies identificadas se encontró *Pseudonitzschia australis* (Fritz, *et al.*, 1992).

En México también se presentó una intoxicación de pelícanos en la bahía de Los Cabos, BCS, en donde se detectó como responsable a la intoxicación al ácido domóico, fungiendo como vectores peces macarelas (Cortés, 1998).

2.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento de *Pseudonitzschia spp*

Los florecimientos tóxicos de *Pseudonitzschia* pueden convertirse en un fenómeno recurrente, por lo que es importante determinar si existe alguna predicción estacional o espacial.

Desde el incidente con DA en Canadá en 1987, se ha estudiado intensamente la ecología de *P. pungens* f. *multiseries*, se ha informado que es capaz de sobrevivir a 30 °C aunque domina con temperaturas más frías, (Villac *et al.*, 1993). Se concluyó que el crecimiento óptimo de *P. pungens* f. *multiseries* se daban en rangos de temperatura entre 15-20 °C. Sin embargo, se han observado florecimientos monoespecíficos de *P. pungens* f. *multiseries* a fines de otoño o en invierno, con bajas temperaturas prevalecientes en el agua (-1 a 3 °C).

Como la temperatura óptima de crecimiento es muy superior a ésta, es evidente que otros factores pudieron haber influido en el inicio del desarrollo de las floraciones (FAO, 2004).

Los nutrientes pueden resultar aun más importantes para el crecimiento del fitoplancton que los efectos directos de los cambios estacionales de temperatura. Las condiciones en zonas poco profundas con circulación restringida pueden favorecer el estrés requerido para iniciar la producción de DA, junto con el necesario exceso de nitrógeno inorgánico (FAO, 2004).

La floración máxima de *P. pungens* f. *multiseries* en Canadá en 1987 sucedió luego de un periodo inusualmente seco a fines del verano, seguido de una intensa tormenta con lluvias a comienzos de septiembre. Se encontró una relación entre alta disponibilidad de nitratos y máximos florecimientos de *P. pungens* f. *multiseries*, atribuida fundamentalmente a desbordes de agua dulce luego de las lluvias (Villac et al., 1993).

El incidente con DA en el otoño de 1991 en aguas del estado de Washington en la costa oeste de los Estados Unidos, ocurrió también luego de un periodo muy caluroso y seco de 45 días de duración, seguido de lluvias a mediados de octubre (Wright y Quilliam, 1995).

En estudios con cultivos realizados por Bates, se encontró que la producción de DA por *P. multiseries* y *P. seriata* comenzaba a fines de la etapa exponencial de su crecimiento para continuar con mayor rapidez durante la fase estacionaria; en cambio, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima* produjeron DA durante la mayor parte de la fase exponencial y no durante la estacionaria.

Para la microalga *P. pseudodelicatissima* la información no es del todo consistente, pues un aislado de aguas de Washington produjo DA tanto durante el final de la fase exponencial como en la estacionaria. La dinámica de la producción de DA por *Nitzschia navis-varingica* fue estudiada por Kotaki (2000), encontrando el comienzo de la producción de DA durante el final de la fase exponencial, acelerándose en la estacionaria (FAO, 2004).

En 1993 Lewis y colaboradores demostraron que la velocidad de producción de DA por *P. pungens* f. *multiseries* durante la fase estacionaria de crecimiento podía reducirse de manera importante disminuyendo ligeramente la temperatura.

Bates y sus colaboradores afirmaron que se requería disponer de nitrato extracelular o de otra fuente de nitrógeno y de luz para producir DA durante la fase estacionaria (FAO, 2004).

Se ha probado que una mayor producción de DA tiene lugar con poco silicato, aun con la misma velocidad de crecimiento del alga. Es muy posible que las floraciones naturales de *P. multiseries*, causantes de importantes cantidades de DA, estuvieran con un severo estrés de silicatos. También se ha demostrado que la producción del DA se ve favorecida por limitantes en la cantidad de fosfatos en el medio de cultivo. La competencia entre velocidades de producción del DA altas en estado estacionario, con velocidades bajas de absorción de nutrientes y con niveles elevados de trifosfato de adenosina (ATP) indica además, que la síntesis del DA requería cantidades importantes de ATP como fuente de energía biogénica (FAO,2004).

2.3.3 Hábitat de las microalgas productoras de DA

Las diatomeas del género *Pseudonitzschia* se encuentran ampliamente distribuidas, en la tabla 2 se muestran algunas especies del género y el lugar en donde han sido encontradas

Tabla 2. Distribución en aguas de diferentes especies de *Pseudonitzschia* (FAO, 2004)

Especie	Océano	Zona
<i>P. multiseriis</i>	Atlántico	Norteamérica, Sudamérica y Europa
	Pacífico	Norteamérica, Japón
<i>P. pseudodelicatissima</i>	Atlántico	Europa y África (Estrecho de Dinamarca a África del noroeste, incluyendo las aguas costeras noruegas y danesas) Canadá y EUA (Golfo de México) y Argentina
	Pacífico	California, Washington
<i>P. australis</i>	Atlántico	España, Portugal, Suroeste de África y Argentina
	Pacífico	Perú, Chile, Nueva Zelanda, México (Golfo de California) , Costa oeste de América del Norte desde San Diego (California) a Puget Sound, Washington, Columbia Británica.
<i>P. delicatissima</i>	Atlántico	Aguas costeras noruegas, aguas Danesas, África del noroeste, Rhode Island y Argentina y Lousiana, EUA
	Pacífico	California
<i>P. pungens</i>	Atlántico	Argentina y Lousiana, EUA
	Pacífico	Aguas costeras de EUA (Penn Cove, Washington) y México (Golfo de California) , Nueva Zelanda, Mar de Japón, Federación Rusa.
<i>P. seriata</i>		Mar de Barents, Mar noruego, Skagerrak, Bahía de Kiel, Canal de la Mancha, Groenlandia hasta Terranova Alaska, Columbia Británica. Aguas costeras de Argentina

2.4 Absorción y eliminación de DA en organismos acuáticos.

Las microalgas son el alimento natural de moluscos bivalvos filtradores (ostras, ostiones, choritos, cholgas, almejas, entre otros), de peces herbívoros y de larvas de diferentes organismos marinos, como lo son moluscos y crustáceos, que a su vez son alimento marino esencial para otros animales marinos carnívoros y para los seres humanos (Suárez *et al.*, 1999).

Algunos organismos acuáticos como los moluscos bivalvos, cangrejos, langostas, entre otros; acumulan toxinas por filtración directa de las células del plancton o al alimentarse directamente con organismos contaminados.

La velocidad de acumulación de las toxinas por organismos marinos filtradores es específica para cada especie y en la mayoría de los casos esta relacionada directamente con la cantidad de células disponibles a ellos. La velocidad de acumulación de algas tóxicas es muy variable para una zona dada. La velocidad de eliminación de la toxina depende de la estación, retardando las bajas temperaturas la liberación de la toxina; sin embargo, no está bien entendido la forma en que la temperatura afecta la absorción y liberación de toxinas. Además, la velocidad de eliminación depende mucho del lugar donde esté almacenada la toxina en el animal, por ejemplo, si las toxinas se encuentran en el tracto gastrointestinal son eliminadas mucho más rápido que las toxinas unidas a tejidos (FAO, 2004).

La mayor parte de la información disponible es relativa a moluscos bivalvos. Se ha demostrado que el DA es eliminado de los mejillones bastante rápido (Villac *et al.*, 1993).

Estudios preliminares de alimentación con el mejillón Greenshell (*Perna canaliculus*) de Nueva Zelanda, al que se proporcionó *P. pungens* f. *multiseries* mostraron contaminación de los mejillones con DA aunque la toxina fue eliminada rápidamente al cesar la alimentación. Bajo algunas condiciones las velocidades de ingestión y excreción eran equivalentes, no acumulándose en los tejidos (FAO, 2004).

Al alimentar almejas (*Placopecten magellanicus*) con células de *P. multiseries* con alto contenido de DA (4-6,6 pg/célula) durante 22 días, seguidos de 14 días de alimentación con microalgas no tóxicas, el DA fue incorporado dentro de las 24 horas con absorciones incrementadas pasados seis días. El orden de concentración del DA concentrado en tejidos era: glándula digestiva >> restante tejido blando >> músculo abductor. En la glándula digestiva se registró un máximo de 3 108 µg/g; sin embargo, sólo se encontraron cantidades traza (0,7-1,5 µg/g) en el músculo aductor. Al final de la exposición, se había incorporado a los tejidos el 50.9 % del DA proporcionado. El nivel de DA en la glándula digestiva, 14 días después de finalizada la dieta tóxica permaneció elevado, 752 µg/g durante la experiencia; no se mostró enfermedad o mortalidad de las almejas señales atribuibles a una carga elevada de DA. Sin embargo, no fueron evaluados los efectos de largo plazo (Douglas, *et al.*, 1997).

Se dispone de pocos datos sobre los tiempos de permanencia de toxinas en cangrejos y gastrópodos carnívoros; la tendencia general en estos organismos apunta a tiempos de permanencia prolongados. Se informó un periodo de permanencia superior a los dos años para *Siliqua patula*, con una especie no identificada de *Pseudonitzschia* como fuente de la toxina (FAO, 2004).

Más de 400 leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) murieron a lo largo de la costa central de California en mayo y junio de 1998. El probable agente causante fue el DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos por las anchoas herbívoras (*Engraulis mordax*). Las mayores concentraciones de DA se encontraron en las vísceras (223 µg/g), con valores siete veces superiores a los de los tejidos del cuerpo (FAO, 2004).

2.5 Técnicas de análisis para el ácido domóico

2.5.1 Métodos químicos

Entre los métodos químicos para el análisis de ácido domóico, se encuentran la Cromatografía en capa fina, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Electroforesis capilar y Espectrometría de masas, las diferencias entre estas técnicas radican en sus límites de detección, y sus características en general como lo es el costo del equipo o si es que la técnica es o no cuantitativa. En la tabla 3 se pueden observar algunas de las diferencias entre estas técnicas (Botana, 2000).

Como se puede observar en la tabla 3, las características del método por HPLC es cuantitativo, lo que no es cromatografía en capa fina y espectrometría de masas, el cual además requiere una previa separación del compuesto. También es importante resaltar que la sensibilidad por el método de HPLC, es mayor a comparación de dichos métodos.

Aún cuando otro método aplicable de forma cuantitativa es la electroforesis capilar, este trabajo se enfocará a la cuantificación por HPLC debido a que el método oficial establecido por el AOAC para la cuantificación de ácido domóico establece a la HPLC como método de cuantificación oficial.

Tabla 3. Características de las diferentes técnicas para la cuantificación de ácido domóico.

Técnica	Límite de detección	Características
Cromatografía en capa fina	10 µg/g	Semicuantitativo Se pueden emplear extractos crudos Aplicable a varias matrices biológicas Económico
HPLC	20-30 ng/g (UV) 15 pg/g (fluorescencia)	Cuantitativo Se requiere derivatización cuando se emplea el detector de fluorescencia. Pueden cuantificarse sus isómeros El equipo requerido es costoso.
Electroforesis capilar	150 ng/g	Cuantitativo Alta resolución Volúmenes muy pequeños de inyección El equipo requerido es costoso.
Espectrometría de masas	1 µg/g	Cuantitativo en algunas modalidades Requiere separación previa por cromatografía o electroforesis capilar. Puede requerir derivatización de la muestra. El equipo requerido es muy costoso.

2.5.1.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El sistema más sencillo para HPLC consiste básicamente de cinco elementos: bomba de flujo, sistema para la inyección de la muestra, columna de cromatografía, sistema de detección y un procesador de datos. Los equipos de detección más populares para el análisis rutinario de biotoxinas marinas son los detectores de UV y de fluorescencia. Para el análisis de datos se puede emplear desde un graficador analógico hasta sistemas computarizados que permiten la comparación automática de las corridas con los estándares (Cortés, 1998).

La cromatografía de fase inversa (RCP) es una forma de partición cromatográfica en la cual la fase estacionaria es hidrofóbica y la fase móvil tiene una mayor polaridad que la fase estacionaria. En este tipo de cromatografía, la separación de las muestras es relativa a las propiedades hidrofóbicas del soluto, así, mientras más hidrofílicas sean, serán eluidas con mayor rapidez.

Para la RCP es utilizada como fase móvil un solvente orgánico miscible en agua como son el acetonitrilo o el metanol (Cortés, 1998).

El método de HPLC es el preferido para la cuantificación de ácido domóico, ya sea empleando un detector de Ultra Violeta o de fluorescencia, siendo este último más sensible, sin embargo requiere una previa derivatización de la muestra. La muestra que se cree contiene ácido domóico se separa en una columna de fase reversa C-18 empleando un gradiente isocrático cuyo flujo sea de 1-1.5 mL/min. Se prefieren las fases móviles y es común que se empleen mezclas de acetonitrilo y agua acidificada con ácido tricloroacético (TCA) o ácido fosfórico (Cortés, 1998). Se recomienda emplear una fase móvil ácida para suprimir la ionización los grupos carboxilo (FAO, 2004). La metodología establecida por el AOAC emplea la mezcla de acetonitrilo-agua acidificada con ácido fosfórico a pH aproximadamente de 2.5 (Harwitz, 2000). Sin embargo, existen interferencias encontradas comúnmente que pueden dar falsos positivos en extractos crudos. Por ejemplo, se ha observado que el triptofano puede encontrarse en altas concentraciones en los tejidos de moluscos o peces analizados, y debido a su semejanza estructural con el DA (figura 3) eluye muy cercano a él (Quilliam, *et. al.*, 1989), por ello es de gran importancia encontrar las condiciones idóneas con el fin de que exista una buena separación entre estos dos compuestos.

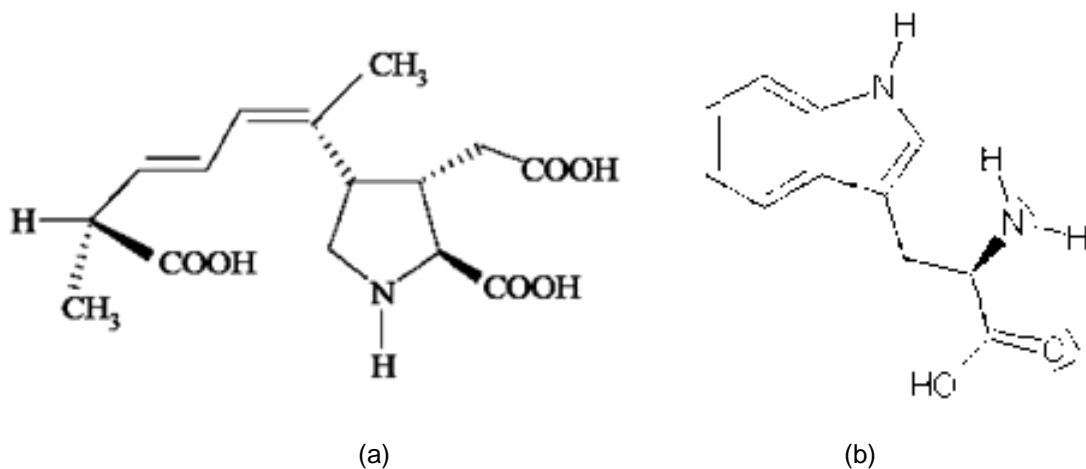


Figura 3. Muestra la semejanza estructural entre el DA (a) y el Triptofano (b).

No obstante que, existen algunos problemas con el procedimiento antes mencionado, es el método oficial establecido en el AOAC. Entre los problemas se encuentran: a) la descomposición parcial del DA durante la extracción, especialmente a niveles traza; b) un gran tiempo de preparación de la muestra; c) El extracto no puede almacenarse (debido a la rápida descomposición del DA en solución ácida) (Wright y Quilliam, 1995). Es por este último punto que en la metodología establecida en el AOAC, se menciona que la muestra deberá analizarse el mismo día en que se realiza la extracción ácida.

El detector más empleado para la cuantificación de ácido domóico por HPLC es el UV a una longitud de onda de 242 nm, ya que dicha biotoxina absorbe fuertemente a esa longitud de onda (Cortés, 1998).

2.6 Toxicología del DA

El límite seguro de DA que se estableció en Canadá tras la intoxicación de 1987 es de 20 µg/ g de tejido animal analizado (Iverson *et al.*, 1990; Iverson y Truelove, 1994), y hasta el momento este nivel ha sido adoptado por otros países para el DA, incluyendo a México según la NOM-031-SSA1-1993 (Secretaría de Salud, 1995).

Durante el incidente en Canadá en 1987, se encontraron concentraciones de ácido domóico en un rango de 300-1000 µg/g de tejido de mejillón analizado, y se estima que las personas intoxicadas pudieron haber consumido de 1 a 2 mg/kg de la toxina (Wright y Quilliam, 1995).

2.6.1 Modo de acción del DA

La absorción del DA ocurre en la mucosa gastrointestinal; sin embargo, dicha absorción es muy lenta (Iverson *et al.*, 1990). La tasa de transferencia de DA al tejido cerebral ha sido medido en ratas y se ha observado que es también lento (Preston y Hynie, 1991). El DA administrado oralmente se ha encontrado que es excretado totalmente en heces (Iverson *et al.*, 1990). Existen reportes de que en ratas y monos, la vida media de DA en la sangre es de 65 minutos y es totalmente eliminado después de dos horas (Suzuki Y Hierlehy, 1993; Truelove e Iverson, 1994).

El DA debido a su semejanza estructural con el ácido glutámico (GLU) (figura 4) cuenta con alta afinidad hacia sus receptores ubicados en el Sistema Nervioso Central (SCN), los cuales se encuentran en gran proporción en las neuronas presentes en el hipocampo, en centros responsables del procesamiento de la memoria a corto plazo (Botana, 2000).

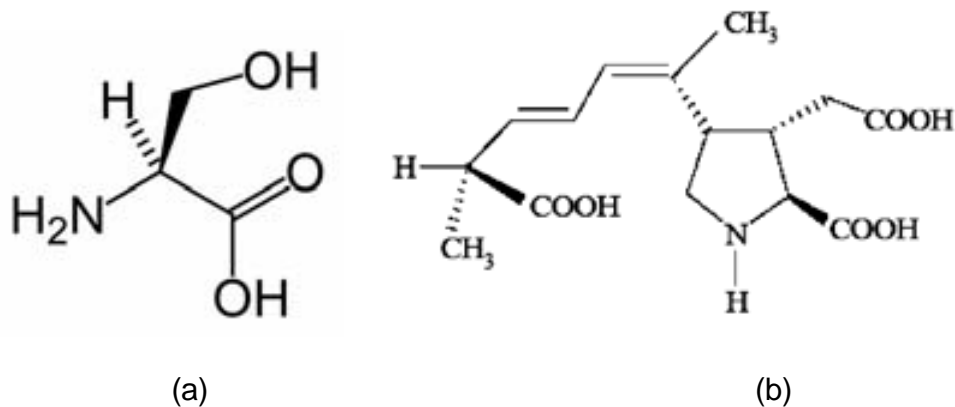


Figura 4. Muestra la semejanza estructural entre el Ácido Glutámico (a) y el DA (b).

El ácido domóico se considera como una neuroexcitoxina debido a que activa a los receptores del ácido glutámico abriendo un canal iónico que deja pasar al interior de la neurona grandes cantidades de Ca^{2+} , lo que hace que se incremente su concentración dentro de la misma, causando su despolarización y ocasionando así la destrucción de la neurona y de esta forma la pérdida de la memoria a corto plazo en las personas intoxicadas, lo cual puede llegar a ser irreversible, provocando que algunas personas padezcan de amnesia de por vida, es por este motivo por lo que se le conoce como **Intoxicación Amnésica por Moluscos** (Pérez, 2002).

2.6.2 Síntomas Clínicos de la ASP

Dentro de las primeras 24 horas después de ingesta de moluscos contaminados por ácido domóico, se ha observado que se presentan síntomas como dolor abdominal, vómito, diarrea. Después de 48 horas de la ingesta algunos síntomas presentados han sido dolor de cabeza, pérdida de memoria a corto plazo, vértigo, desorientación, confusión y coma. Además de síntomas como el aumento de la presión arterial, retención urinaria y taquicardia. En algunos casos se ha presentado hasta la muerte (Botana, 2000).

Según información obtenida de la intoxicación en 1987 en Canadá, de 107 casos de personas intoxicadas, 14 personas presentaron severos daños neurológicos y 4 personas murieron (Teitelbaum, *et al.*, 1990; Perl, *et al.*, 1990)

Se han reportado casos en que la pérdida de memoria fue de forma definitiva, esto sin importar la edad de la persona intoxicada.

2.6.3 Toxicidad del DA en organismos marinos

En el otoño de 1993, tuvo lugar en la Bahía de Fundy en Canadá una mortalidad inexplicada de vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*); sus glándulas digestivas registraron 93,4 µg DA/g. En ensayo, las vieiras nadadoras (*Chlamys hastata*) murieron rápidamente, dentro de las 12 horas, luego de la exposición a cultivos de *P. multiseriis tóxica*. Aunque se ha informado que algunos moluscos bivalvos contienen altos niveles de DA sin ningún síntoma (Douglas *et al.*, 1997).

Se reporto que las vieiras nadadoras *Chlamys hastata*, al exponerse al DA alimentándolas con *Pseudonitzschia multiseriis*, perdieron sus respuestas motoras o de fuga resultando así presa fácil para depredadores como los cangrejos, pudiendo originar en estos una intoxicación (FAO, 2004).

En septiembre de 1991, las muertes inexplicables de pelícanos en la Bahía Monterrey, en California, fueron atribuidas a un brote de intoxicación por DA producido por *Pseudonitzschia australis*, ingeridas por anchoas y a su vez ingeridas por los pelícanos (FAO, 2004).

En enero de 1996, se atribuyó la muerte de pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) en el Cabo San Lucas, México, lo cual se atribuyó a que se alimentaron con caballa (*Scomber japonicus*) contaminada con *Pseudonitzschia* spp (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

Se investigaron los efectos fisiológicos del DA en los invertebrados marinos, ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y mejillón de California (*Mytilus californianus*), conocidos por acumular esta neurotoxina. Las ostras y los mejillones se expusieron continuamente por 48 horas a la diatomea productora de DA *P. pungens* f. *multiseriis*, seguidos de un periodo de liberación de 120 horas. La ostra del Pacífico acumuló rápidamente cargas de DA en tejidos suaves, resultantes en una respuesta de estrés generalizada por el cierre de su caparazón cuatro horas después de introducir las algas, acidosis hemolínfica e hipoxia transitoria aguda. El mejillón de California pareció incrementar su flujo ventilatorio resultante en una suave alcalosis respiratoria no compensada (FAO, 2004).

Más de 400 leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) murieron a lo largo de la costa central de California durante mayo y junio de 1998. Fue identificado como el posible agente causante el DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos por las anchoas herbívoras de la especie *Engraulis mordax* (FAO, 2004).



CAPITULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Diagrama general de trabajo.

En la figura 5 se puede observar el diagrama general de trabajo.

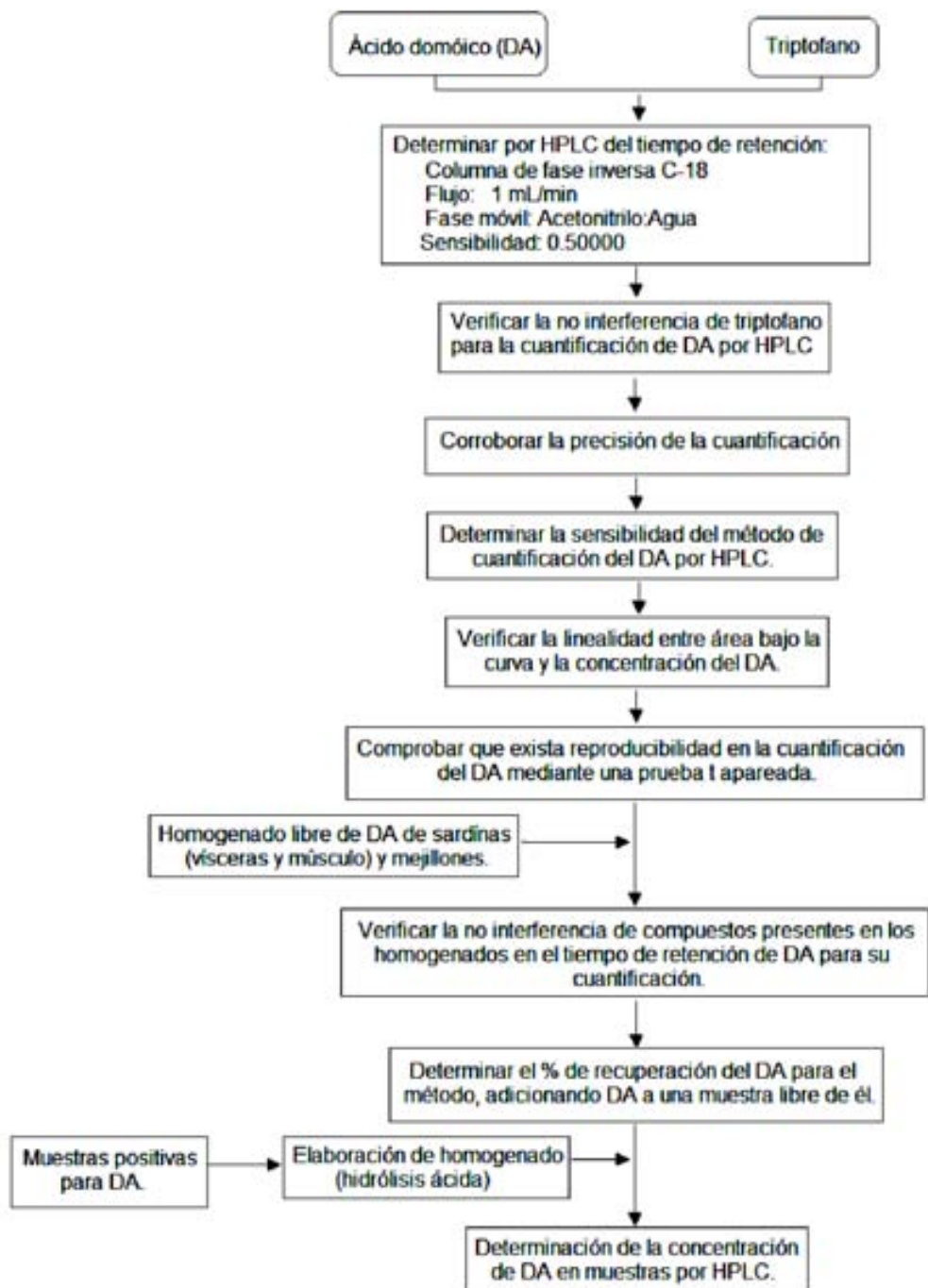


figura 5. Diagrama general de trabajo.

3.2 Cuantificación de DA por HPLC.

3.2.1 Fundamento:

El Ácido Domóico (DA) es una biotoxina marina producida por las microalgas *Pseudonitzchia spp*, dicha biotoxina es capaz de acumularse en algunos animales marinos, entre ellos los filtradores como los moluscos bivalvos (mejillones, ostra, almeja, etc.), también puede encontrarse en peces y crustáceos.

El DA es una neurotoxina debido a que su ingestión por humanos puede producir la Intoxicación Amnésica por Moluscos (ASP), la cual puede provocar la pérdida de memoria a corto plazo, que puede ser permanente, esto debido a que el ácido domóico se une fuertemente a los receptores para el ácido glutámico que se encuentran en gran cantidad en la zona del hipocampo, encargada de la memoria a corto plazo, permitiendo el paso del ion Ca^{2+} al interior de la neurona provocando su despolarización hasta producir una lisis celular.

El DA puede purificarse por diversos métodos cromatográficos y su detección se facilita por espectroscopia UV por poseer un cromóforo fuerte. Este compuesto absorbe a 242 nm en el rango del ultravioleta, lo que facilita su identificación y cuantificación. El método oficial establecido por el AOAC (2000) para su cuantificación es por HPLC, en donde debe llevarse a cabo la extracción previa de la toxina en ambiente ácido.

La NOM-031-SSA1-1993 (Secretaría de Salud, 1995) establece que el límite máximo que puede contener un molusco bivalvo de DA son 20 $\mu\text{g/g}$ de tejido animal analizado, este es el límite máximo establecido como seguro desde la intoxicación en humanos en Canadá en 1987.

3.2.2 Material y Equipo:

Material:

- Matraz Erlen Meyer 250 mL
- Parrilla eléctrica
- Probeta 100 mL con tapón
- Tubos eppendorf
- Espátula
- Vidrio de Reloj
- Micropipeta de 10-200 μ L BIOHIT
- Micropipeta de 5 – 50 μ l BIOHIT
- Jeringa para HPLC
- Acrodiscos
- Frascos vial
- Tubos para centrífuga 50 mL
- Equipo Millipore
- Filtros Millipore 0.45 μ m
- Pipeta volumétrica 2 mL, 5 mL
- Vaso de precipitados 50 mL, 250 mL
- Matraz aforado 50 y 25 mL
- Pipeta graduada 5 mL
- Malla No. 10

Equipo:

- Centrífuga Eppendorf 5702
- Balanza analítica Sartorius
- Potenciómetro Corning 430
- Sonicador BRANSON modelo 3210
- Equipo para HPLC PERKIN ELMER modelo 250 con detector UV.
- Columna de fase inversa de nucleosil 100-5 C-18 150 mm x 5 mm x 4.6 mm Macherey-Nagel
- Licuadora

Reactivos:

- Agua desionizada
- Ácido domóico Sigma D6152
- Triptofano Sigma T-0254
- Acetonitrilo grado HPLC JT BAKER 9017-03
- Ácido fosfórico al 8.5% JT BAKER 01143 (0260).
- Ácido Clorhídrico 0.1M JT BAKER 9535-05.

3.2.3 Preparación de la fase móvil

Para elaborar la fase móvil es necesario adicionar 2 mL de ácido fosfórico al 8.5% a 873 mL de agua desionizada y mezclarse. Ya que se tiene el agua acidificada es medir el pH con un potenciómetro y si es necesario ajustarse a 2.65 ± 0.05 .

Una vez fijado el pH, adicionar 125 mL de Acetonitrilo grado HPLC y agitar.

La fase móvil deberá filtrarse previa a su uso en el equipo Millipore empleando filtros Millipore con tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y desgasificarse durante una hora empleando un sonicador, para eliminar el aire que pueda estar presente en la disolución y se puedan dañar las bombas del equipo para HPLC.

3.2.4 Elaboración de una disolución de triptofano.

Para realizar la disolución de triptofano si se parte de triptofano marca Sigma, con una pureza del 98%, deberán pesarse 0.0128 g de triptofano empleando una balanza analítica y llevarse a un volumen de 50 mL con agua destilada, para posteriormente llevar a cabo la determinación del tiempo de retención de esta sustancia por HPLC bajo las mismas condiciones que se llevará a cabo la cuantificación de DA.

3.2.5 Preparación de los estándares de DA.

A partir de la solución Stock de DA con concentración de $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ elaborar cinco disoluciones con concentraciones diferentes para verificar la linealidad, dichas concentraciones son: 1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$, empleando una micropipeta de 10-200 μL . Cada una de las disoluciones deberá llevarse a cabo el mismo día de la determinación para evitar la descomposición del ácido. Durante el tiempo que no se empleen será necesario almacenarlas en refrigeración y protegerlas de la luz hasta el momento de la determinación.

3.2.6 Extracción de DA a partir de las muestras de animales acuáticos (Moluscos bivalvos, peces)

En el caso de los moluscos bivalvos lavar el exterior de las conchas con suficiente agua, abrir las valvas y lavar el interior con agua limpia con el fin de eliminar arena que pudiera estar presente, además de otros materiales extraños. Remover la carne del interior de las valvas.

Colectar de 100-150 g de carne o vísceras y drenar durante 5 minutos empleando una malla con tamaño del número 10.

Moler la carne limpia en una licuadora casera hasta obtener el homogenado, pesar 50 g en un vaso de precipitados limpio de 250 mL, empleando una balanza analítica, adicionar 50 mL de HCl 0.1M y agitar vigorosamente, calentar a temperatura de ebullición y mantener a dicha temperatura durante 5 minutos. Transferir el extracto obtenido inmediatamente en un baño de agua-hielo y enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente (aproximadamente 10 minutos).

Verter el extracto a una probeta de 100 mL con tapón y llevar a un volumen de 100 mL con HCl 0.1M. Agitar para homogenizar el extracto diluido. Trasladar 50 mL de la mezcla homogénea a un tubo de centrifuga del mismo volumen y centrifugar durante 5 minutos a 3000rpm. Transferir de 1 a 5 mL del sobrenadante con ayuda de una pipeta volumétrica a un matraz aforado de 50 mL, llevar al aforo con agua desionizada.

Filtrar una alícuota de 1 a 2 mL del sobrenadante diluido a través de un filtro desechable (acrodisco), y coleccionar el filtrado en un frasco vial de 4 mL.

Realizar la inyección en el equipo para HPLC, de acuerdo a las condiciones indicadas en el punto 3.2.8.

Es importante mencionar que la extracción deberá llevarse a cabo el mismo día que se haga la cuantificación por HPLC, debido a que el DA se degrada fácilmente en disolución ácida. La muestra deberá mantenerse en refrigeración y protegida de la luz mientras que no se realice la cuantificación.

Durante todo el proceso de extracción deberá cuidarse que la muestra tenga poco contacto con la luz debido a que ésta puede provocar la degradación del DA, lo que podría provocar obtener una subestimación de la concentración real del DA en la muestra.

Realizar este procedimiento tanto para los blancos negativos, como para las muestras positivas, además de la muestra empleada para determinar el porcentaje de recuperación con la previa adición de una cantidad conocida de DA que durante la determinación se obtenga un valor intermedio en la curva patrón.

3.2.7 Preparación de la muestra para la determinación del porcentaje de recuperación de la metodología.

Para determinar el porcentaje de recuperación de DA durante la extracción es necesario adicionar 1.75 mL de la disolución stock de DA (2 µg/ µL) a 50.36 g de músculo o vísceras ya homogenadas por la licuadora y se continúa el procedimiento de extracción en medio ácido según se menciona en el punto 3.2.6.

3.2.8 Cuantificación por HPLC y determinación de tiempo de retención.

Para la de determinación es necesario contar con un equipo para HPLC marca PERKIN ELMER modelo 250, y un detector UV, empleando una columna de fase inversa de Nucleosil 100-5 C-18, con tamaño de partícula de 5 µm, con longitud de 150mm y un diámetro interno de 4.6 mm.

Se inyectarán 20 μL de la solución estándar correspondiente (triptofano o DA), el tiempo de corrida será de 10 minutos, con un flujo de la fase móvil de 1 mL/min, la lectura se realizará a 242 nm y con una sensibilidad del detector de 0.5000.

Lo anterior se realizará por quintuplicado para cada una de las concentraciones preparadas, para determinar la precisión del método.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se determinará el tiempo de retención del DA y del triptofano, con esto deberá verificarse que bajo las condiciones trabajadas existe una buena separación entre estos dos compuestos.

Con los datos obtenidos para las cinco disoluciones de ácido domóico elaborar una curva patrón de área bajo la curva vs concentración.

Para verificar la reproducibilidad del método es necesario realizar una nueva disolución estándar con concentración de 5 ng/ μL que es el punto intermedio de la curva patrón, y llevar a cabo la cuantificación por quintuplicado con una diferencia de tiempo de 20 días y con los datos obtenidos realizar un análisis estadístico aplicando la prueba de t apareada.

Para determinar la concentración de DA deberá emplearse la ecuación de la recta obtenida para la relación lineal entre área bajo la curva y concentración. Además deberá considerarse el % de recuperación para evitar una subestimación en el resultado. Finalmente, la concentración de DA en la muestra deberá reportarse como $\mu\text{gDA/g}$ de muestra analizada.



CAPITULO IV

4. Resultados y Discusión

4.1 Determinación del tiempo de retención del triptofano por HPLC.

Bajo las condiciones mencionadas en el punto 3.2.8, se obtuvieron los resultados mencionados en la tabla 4, en donde se muestran algunos parámetros estadísticos como son el valor promedio obtenido, la desviación estándar y el coeficiente de variación en porcentaje.

Tabla 4. Valores de tiempo de retención para triptofano.

Dato	Tiempo de retención (minutos)
1	5.407
2	5.397
3	5.383
4	5.370
5	5.347
Promedio	5.381
Desviación estándar	0.023
%CV	0.437

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 4, se encontró que el tiempo de retención del triptofano bajo las condiciones anteriormente establecidas es de 5.381 ± 0.023 min ($\bar{x} \pm \sigma$).

Como se puede observar en la tabla 4 el coeficiente de variación es de 0.437%, el cual es un valor bajo lo que indica que los datos obtenidos son precisos y el valor de tiempo de retención obtenido es estadísticamente confiable.

4.2 Determinación del tiempo de retención del ácido domóico.

La determinación se realizó, bajo las mismas condiciones especificadas para el triptofano, así, los valores obtenidos para tiempo de retención del DA se encuentran en la tabla 5, mostrándose además algunos parámetros estadísticos (promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV)).

Tabla 5. Valores de tiempo de retención obtenidos para DA.

Dato	Tiempo de retención (minutos)
1	7.737
2	7.717
3	7.637
4	7.650
5	7.623
Promedio	7.673
Desviación estándar	0.05988
%CV	0.6632

Considerando los resultados mencionados en la tabla 5, se determinó que el tiempo de retención del ácido domóico bajo las condiciones trabajadas es de 7.673 ± 0.060 minutos ($x \pm \sigma$).

Como se puede observar en los tiempos de retención del triptofano ($5.381 \text{ min} \pm 0.023 (x \pm \sigma)$) y DA ($7.673 \text{ min} \pm 0.060$) existe una diferencia de mas de dos minutos lo que nos indica que en una muestra que contenga ambos compuestos habrá una buena separación entre estos y por tanto el triptofano no interferirá en la cuantificación de DA.

4.3 Verificación de la linealidad para diferentes concentraciones del ácido domóico y precisión en la determinación.

Con las concentraciones de ácido domóico especificadas en el punto 3.2.5 (1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0 ng/ μL), se realizó la determinación bajo las condiciones especificadas en el punto 3.2.8 para cada una de las concentraciones por quintuplicado. Los resultados de área bajo la curva obtenidos para cada una de las cinco concentraciones se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Área bajo la curva obtenida para las diferentes concentraciones de ácido domóico y parámetros estadísticos de las determinaciones.

Concentración (ng/ μL)	1.25	2.5	5.0	12.5	25.0
Repetición	Área bajo la curva				
1	5971191	13213360	31859184	69136888	113287280
2	5893998	12564390	26041804	74400400	110039840
3	4907148	13084037	25645694	67013204	118088808
4	6068437	13026640	25449272	70941672	115539944
5	5548708	13656500	25586668	63760376	97839408
Promedio	5677896	13108985	25680610	69050508	110959056
Desviación estándar	473282.77	391999.24	253838.02	4010654.9	7908992.5
%CV	8.33	2.99	0.99	5.81	7.13



Este valor no fue considerado para los cálculos debido a que estadísticamente se detectó que se trataba de un valor anómalo. La prueba estadística para evaluar si el dato era o no un dato anómalo fue mediante el método Q de Dixon. La prueba estadística se llevo a cabo mediante los siguientes cálculos:

$$Q = \frac{|Valor\ sospechoso - valor\ mas\ cercand|}{|valor\ mas\ grande - valor\ mas\ pequeño|}$$

$$Q = \frac{|31859184 - 26041804|}{|31859184 - 25449272|}$$

$$Q = 0.91$$

Nivel de significancia :

0.05

Re gla de decisión:

Si $Q_{Calculado} > Q_{critico}$ entonces no son iguales

Valor crítico (obtenido en tablas) :

$$Q_{critico} = 0.717$$

Decisión

A un nivel de significancia del 5% el valor sospechoso es un valor anómalo

Como se puede observar en la tabla 6, los valores de % de coeficiente de variación son bajos (menores al 10%), lo que nos indica que hay precisión al realizar las diferentes determinaciones.

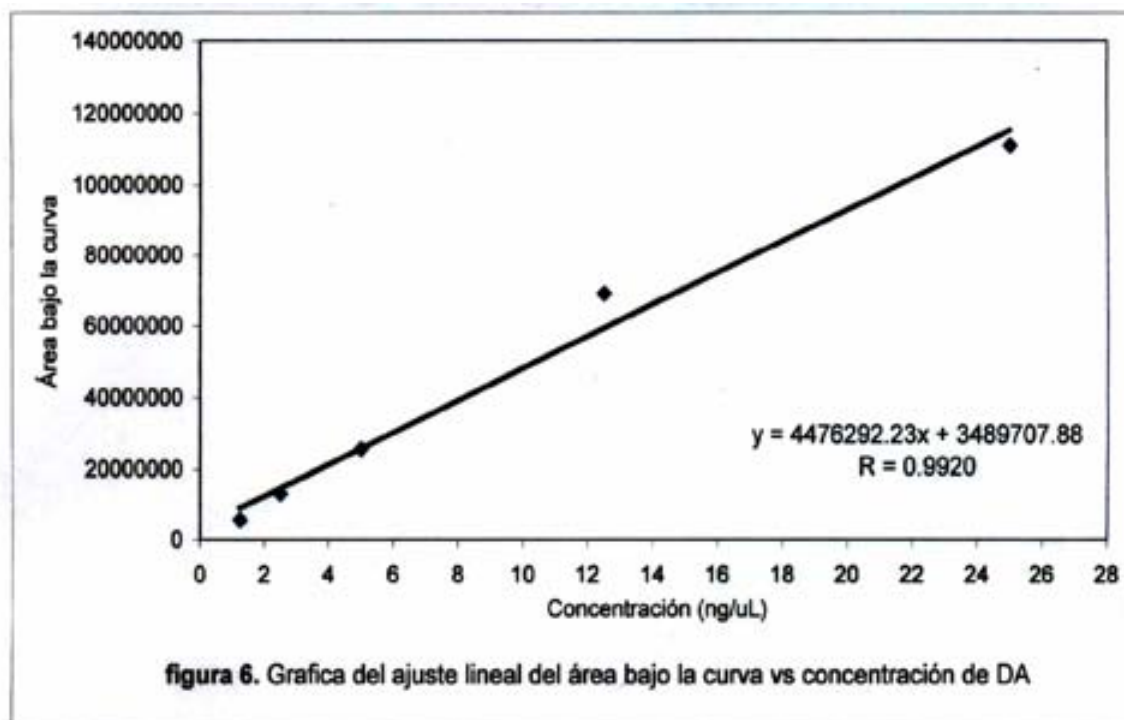
En la tabla 7 se pueden observar los valores promedio obtenidos de área bajo la curva para cada una de las concentraciones.

Tabla 7. Datos empleados para la verificación de la linealidad entre área bajo la curva y concentración.

Concentración (ng/ μ L)	Área bajo la curva
1.25	5677896
2.5	13108985
5.0	25680610
12.5	69050508
25.0	110959056

Con los datos mostrados en la tabla 7 se elaboró el gráfico de área bajo la curva contra concentración de DA (figura 6), con el fin de verificar si existe linealidad entre concentración y área bajo la curva en el intervalo de concentraciones de 1.25 a 25 ng/ μ L.

Con base al gráfico representado en la figura 6, se pudo determinar que existe una relación lineal entre área bajo la curva y concentración de ácido domóico en el intervalo de 1.25 a 25 ng/ μ L, esto se corrobora observando el coeficiente de correlación (R) obtenido a partir de la regresión lineal de los datos, cuyo valor es de 0.9920, el cual es aceptable para hacer dicha afirmación. Además fue posible obtener una ecuación de la recta que describe el comportamiento para dicho intervalo de concentraciones.



Uno de los cromatogramas obtenidos para cada concentración empleados en la grafica de la verificación de la linealidad se muestran en la sección del apéndice (A3-A7).

4.4 Verificación de la Reproducibilidad de las determinaciones.

La verificación de la reproducibilidad de las determinaciones se llevó a cabo para la concentración del punto intermedio de la curva, es decir, para la concentración de 5.0 ng/μL de ácido domóico, para lo cual, se realizó la determinación para dicha concentración nuevamente por quintuplicado bajo las mismas condiciones, y los resultados obtenidos se trataron mediante una prueba t, para verificar si estadísticamente existe reproducibilidad al realizar la cuantificación.

Los resultados obtenidos la primera y segunda vez de la determinación para la concentración antes mencionada se señalan en la tabla 8. Es importante mencionar que dichas determinaciones se realizaron en días diferentes y con nuevas fases móviles, además de que la disolución con la que se cuantificó también se realizó por separado.

Tabla 8. Datos de área bajo la curva obtenidos la determinación de la reproducibilidad para ácido domóico concentración 5.0 ng/μL.

Dato	Determinación 1 (28-07-2008)	Determinación 2 (08-08-2008)	Diferencia
1	26041804	26356332	-314528
2	25645694	22195780	3449914
3	25449272	24076724	1372548
4	25586668	25998660	-411992
Promedio (\bar{x}_d)			1023985.5
Desviación estándar (s_d)			1812941.87

Para determinar si existe o no reproducibilidad de las cuantificaciones para una misma concentración, fueron empleados los datos establecidos en la tabla 8 para realizar una prueba estadística conocida como t apareada, para un nivel de significancia del 5%, para lo cual se aplicó la ecuación 1:

$$t = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \dots\dots\dots 1$$

En donde:

\bar{x}_d = Promedio de las diferencias.

s_d = desviación estándar de las diferencias

n = número de datos.

Sustituyendo la ecuación 1:

$$t = \frac{1023985.5\sqrt{4}}{181294.87}$$

$$t = 1.13$$

Al llevar a cabo la prueba t para verificar la reproducibilidad entre los datos, seleccionando la concentración de 5.0 ng/ μ L por ser el punto intermedio en la gráfica para verificar la linealidad, se encontró que el valor límite superior de tablas (3.18) (Miller, 1993) es mayor que el valor de t obtenido para esta prueba (1.13), lo que nos indica que a un nivel de significancia de un 5%, es posible que los valores obtenidos sean estadísticamente iguales, por lo tanto que existe reproducibilidad entre las determinaciones hechas en diferentes días bajo las mismas condiciones, variando las posibles fuentes de error como lo son la fase móvil utilizada y la disolución introducida al cromatógrafo.

4.5 Verificación de no interferencia con el DA.

Para verificar la no interferencia con el ácido domóico se realizó con un blanco negativo de mejillones, músculo y vísceras de sardina, que no contenían dicho compuesto.

De esta forma como se puede observar en las figuras 5, 6 y 7, que corresponden a los cromatogramas de los diferentes extractos, no existe interferencia en el tiempo de retención del ácido domóico, ya que solo al inicio de los mismos aparecen algunos picos, pero a partir de los 7 minutos no hay ningún compuesto que sea detectado en el sistema cromatográfico. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado y en cada uno de los tres casos se obtuvo el mismo resultado.

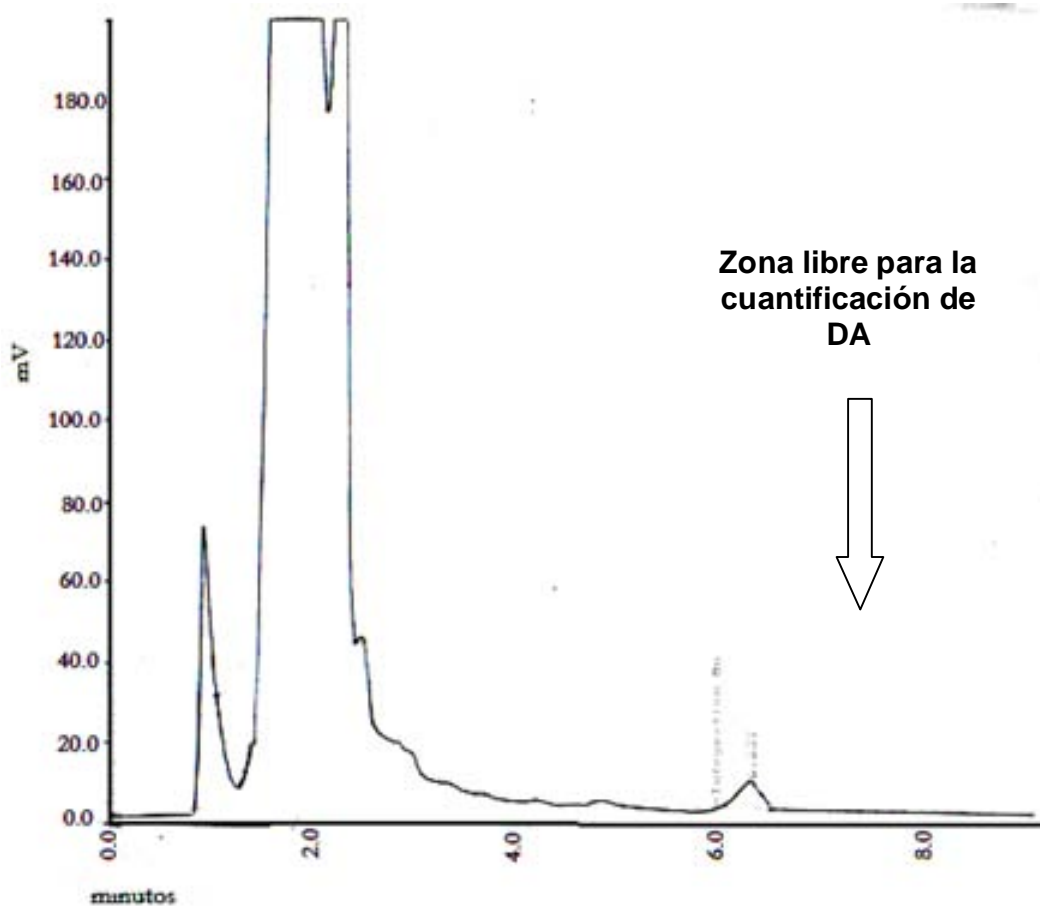


Figura 5. Cromatograma obtenido para el blanco negativo de mejillones.

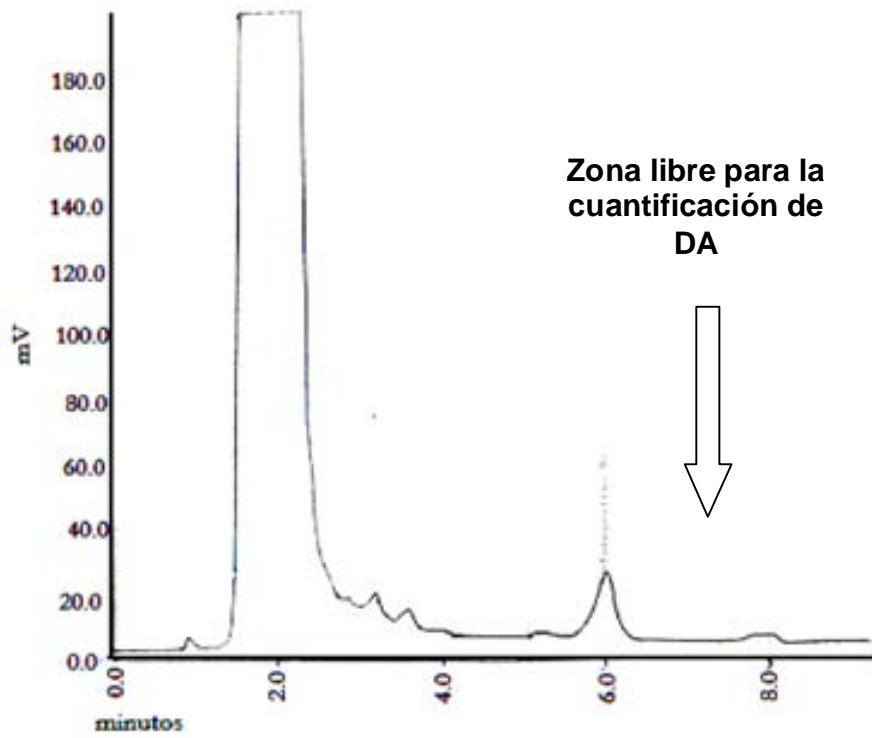


Figura 6. Cromatograma obtenido para el blanco negativo de vísceras de sardina.

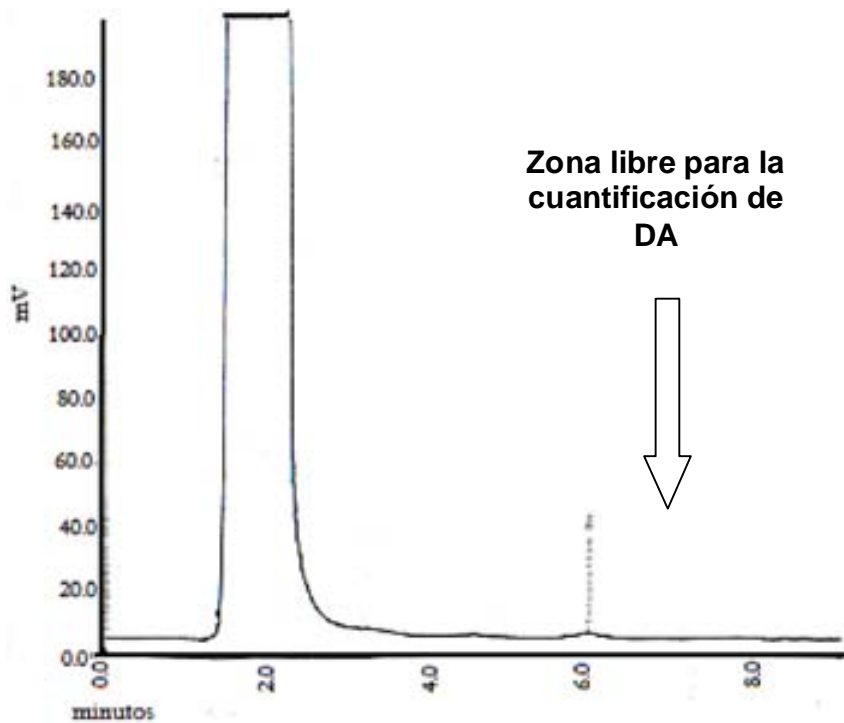


Figura 7. Cromatograma obtenido para el blanco negativo de músculo de sardina.

En lo que respecta a la verificación de no interferencia de ácido domóico en los blancos negativos, se encontró que bajo las condiciones de trabajo para la cuantificación no exhibió interferencia en la señal del sistema cromatográfico arriba de 7 minutos, esto se observó para los tres materiales biológicos donde se desarrollo el método de extracción (vísceras y músculo de sardina, y mejillones).

4.6 Determinación del porcentaje de recuperación del DA.

Para llevar a cabo la determinación del porcentaje de recuperación de DA se adicionaron 1.75 mL de la disolución Stock de DA (2 mg/mL) a una muestra de mejillones libre de ésta biotoxina y se siguió el procedimiento de extracción.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para esta determinación al realizar la cuantificación por HPLC de acuerdo a las condiciones indicadas en el punto 3.2.8 de la metodología, la determinación se llevó a cabo por quintuplicado.

Para determinar la concentración de DA en la muestra se realizó una interpolación en la gráfica del ajuste lineal obtenido en el punto 4.3.

Es importante mencionar que se hizo una modificación a la metodología pues en lugar de aforar de 1-5 mL del centrifugado a 50mL se tomaron 10 mL del centrifugado y se llevó al volumen de 50 mL con agua desionizada, lo cual fue considerado para los cálculos.

Tabla 9. Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de recuperación del DA empleando la metodología establecida.

Dato	Área bajo la curva	Concentración			% recuperación
		(ng/uL)	Experimental (mg/50.36g mejillón)	Teórico (mg/50.36g mejillón)	
1	22941364	4.35	2.17	3.5	62.1
2	22487568	4.24	2.12	3.5	60.6
3	24304156	4.65	2.32	3.5	66.4
4	22804206	4.31	2.16	3.5	61.6
5	22630436	4.28	2.14	3.5	61.1
Promedio	23033546	4.37	2.18	3.5	62.4
Desviación estándar	130775.9	0.1638	0.0795		2.3327
%CV	3.17	3.75	3.64		3.74

La memoria de cálculo para la determinación del % de recuperación del DA según el método utilizado, se muestra a continuación:

Empleando el valor promedio del área bajo la curva obtenido a partir de los cromatogramas :

$$\text{Área} = 23033546$$

Sustituyendo el valor de área en la ecuación de la recta de la relación lineal :

$$A = 4476292.23 + 3489707.88C$$

en donde :

A = área bajo la curva

C = concentración (ng/μL)

entonces :

$$C = \frac{23033546 - 4476292.23}{3489707.88}$$

$$C = 4.37 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$\left(\frac{4.37 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \right) \left(\frac{1 \mu\text{g}}{1000 \text{ ng}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \right) = 4.37 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\left(\frac{4.37 \mu\text{g}}{\text{mLaforado}} \right) \left(\frac{50 \text{ mL aforo}}{10 \text{ mLalícuota}} \right) = 21.85 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\left(\frac{21.85 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) (100 \text{ mL aforo con HCl}) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \right) = 2.185 \text{ mg} / 50.36 \text{ g mejillón.}$$

En el los 50.36 g de mejillones se adicionaron 1.75 mL de DA concentración 2 mg/mL, por lo tanto fueron adicionados 3.5 mg de DA en 50.36 g de mejillones .

$$\left(\frac{2 \text{ mg}}{\text{mL}} \right) (1.75 \text{ mL}) = 3.5 \text{ mg}$$

Así, el porcentaje de recuperación es :

$$\left(\frac{100\%}{3.5 \text{ mg}} \right) (2.185 \text{ mg}) = 62.4\%$$

De acuerdo a los resultados establecidos en la tabla 9, el porcentaje de recuperación del método de extracción ácida para la cuantificación por HPLC de DA es del 62.4%. Como se puede observar, este valor es bajo, sin embargo coincide con la información localizada en la literatura en donde se menciona que el DA no es totalmente estable en disoluciones ácidas, además si se aplica calor, que es el método de extracción establecido en el AOAC y por tanto la metodología que se adecuó en el laboratorio. Este valor será considerado para la determinación de la concentración de DA de las muestras positivas de dicho compuesto para evitar una subestimación en los mismos.

Aun cuando lo ideal hubiera sido realizar la determinación del porcentaje de recuperación mínimo por triplicado desde el inicio, esto no fue posible por el alto costo del DA; la cuantificación final se realizó por quintuplicado y de esta forma el valor obtenido se puede considerar estadísticamente confiable debido a que se obtuvo un coeficiente de variación bajo (3.74%), lo que nos indica que hubo poca variabilidad entre las determinaciones.

En el apéndice (A8) se puede observar uno de los cinco cromatogramas obtenidos para esta determinación.

4.7 Cuantificación de DA en muestras positivas.

La cuantificación de DA se llevo a cabo en tres muestras contaminadas por ésta toxina proporcionadas por el CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) de Ensenada Baja California, y por el Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA) como intermediario, las cuales estaban codificadas de la siguiente forma: A1, A2 y SQA2.

Las muestras proporcionadas correspondían a vísceras de sardina, las características de colección de las muestras se muestran en la tabla 10, según los datos proporcionados por el CICESE.

De acuerdo a la información proporcionada por el CICESE, las muestras no estuvieron asociadas con ningún florecimiento algal en particular, por lo que no es posible mencionar alguna especie de microalga específica por la que se contaminaron las muestras analizadas, además de que no cuentan con dicha información.

Tabla 10. Características de la recolección de las muestras
contaminadas por DA.

Muestra	Descripción	Lugar de colecta	Fecha de colecta
SQA2	Vísceras de Sardina del Pacífico (<i>Sardinops sagax caeruleus</i>)	San Quintín, Baja California, México	No reportada
A1	Vísceras de Sardina del Pacífico (<i>Sardinops sagax caeruleus</i>)	No reportada	11-01-2007
A2	Vísceras de Sardina del Pacífico (<i>Sardinops sagax caeruleus</i>)	No reportada	23-11-2007

Según reportó el CICESE las muestras las recibieron congeladas y así las mantuvieron; y posteriormente fueron liofilizadas para hacerlas llegar a nosotros, y de esa forma, las tres muestras fueron recibidas en el laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, el día 6 de febrero del 2008.

Desde la fecha de recepción las muestras se mantuvieron liofilizadas y a una temperatura aproximada de -18°C en los recipientes originales y además se conservaron envueltas en papel aluminio durante todo el tiempo hasta el momento de la determinación (19 y 20 de Agosto del 2008).

Las extracción del DA de las muestras se realizó de acuerdo al punto 3.2.6 y la cuantificación de acuerdo al punto 3.2.8.

En la tabla 11 se muestran los valores de humedad correspondientes a las tres muestras proporcionados por el CICESE, dichos valores son importantes para determinar los miligramos de DA por gramo de víscera húmeda.

Tabla 11. Valores de humedad de las muestras analizadas.

Muestra	Peso húmedo de vísceras (g)	Peso seco de vísceras (g)	%humedad
SQA2	9.957	2.831	71.57
A1	15.183	3.727	75.45
A2	10.050	2.486	75.35

Los cálculos para determinar los porcentajes de humedad para cada una de las muestras analizadas se muestran a continuación:

Para la muestra SQA2:

$$P_{agua} = P_{humedo} - P_{seco}$$

$$9.957gph - 2.831ps = 7.126gagua$$

$$\% Humedad = \left(\frac{100\%}{9.957} \right) (7.126)$$

$$\% Humedad = 71.57$$

Debido a que las muestras proporcionadas se encontraban liofilizadas (el agua fue sublimada) entonces, se procedió a restituir el agua antes de realizar el homogenado esto para no perder las proporciones de la metodología, además debido a que la cantidad de muestra es mucho menor a la requerida por la metodología se procedió a disminuir el volumen de adición de HCl y los volúmenes de aforo, todo esto se realizó conservando siempre las proporciones establecidas en la metodología.

4.7.1 Cuantificación de DA en la muestra SQA2

Los valores de área bajo la curva obtenidos a partir de los cromatogramas tras llevar a cabo la metodología de extracción y separación de DA por HPLC, se muestran en la tabla 12, además de la concentración DA en la muestra y algunos parámetros estadísticos.

En el apéndice A9 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos para realizar esta determinación.

Tabla 12. Valores obtenidos para la cuantificación de DA por HPLC.

Dato	Área bajo la curva	ngDA/ μ L	μ gDA/g muestra seca	μ gDA/g muestra fresca	μ gDA/g muestra fresca considerando % de recuperación
1	11169352	1.72	63.90	18.17	29.11
2	11089618	1.70	63.24	17.98	28.81
3	12437192	2.00	74.45	21.17	33.92
4	10910503	1.66	61.75	17.55	28.13
5	12231142	1.95	72.74	20.68	33.14
6	11568564	1.80	67.22	19.11	30.63
Promedio	11567729	1.80	67.22	19.11	30.62
Desviación Estándar	634873.81	0.14183	5.2827	1.5018	2.4068
%CV	5.49	7.86	7.86	7.86	7.86

En la tabla 13 se muestran los datos de la muestra utilizada e información importante para los cálculos de la concentración de DA en la muestra, además de la concentración de DA en la muestra fresca. La concentración real de DA en la muestra se determinó considerando el porcentaje de recuperación determinado en la sección 4.6.

Tabla 13. Características de la muestra SQA2.

Peso de la muestra (vísceras secas) (g)	%Humedad	Volumen de aforo con HCl (mL)	Volumen de alícuota del centrifugado (mL)	Volumen de aforo con agua (mL)	µg DA/g muestra húmeda (real)
2.6848g	71.57	20	2	10	30.62±2.41

A continuación se muestra una memoria de cálculo para la determinación de la concentración de DA en la muestra.

Sustituyendo el valor promedio del área bajo la curva en la ecuación de la recta de la relación lineal :
 $A = 4476292.23 + 3489707.88C$ ecuación de la recta

$$C = \frac{11567729 - 4476292.23}{3489707.88}$$

$$C = 1.80\text{ng}/\mu\text{L}$$

$$\left(\frac{1.80 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \right) \left(\frac{1 \mu\text{g}}{1000 \text{ ng}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \right) = 1.8 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\left(\frac{1.8 \mu\text{g}}{\text{mL aforado}} \right) \left(\frac{10 \text{ mL aforo}}{2 \text{ mL alícuota}} \right) = 9 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\left(\frac{9 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \left(20 \text{ mL aforo con HCl} \right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \right) = 0.18 \text{ mg} / 2.6848 \text{ g vísceras peso seco.}$$

$$\left(\frac{0.18 \text{ mg DA}}{2.6848 \text{ g sardina ps}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 67.22 \mu\text{g DA} / \text{g vísceras ps}$$

$$\left(\frac{67.22 \mu\text{g DA}}{\text{g vísceras ps}} \right) \left(\frac{28.43 \text{ g víscera seca}}{100 \text{ g víscera húmeda}} \right) = 19.11 \mu\text{g DA} / \text{g víscera húmeda}$$

Considerando el % de recuperación (62.4)

$$\left(\frac{19.11 \mu\text{g DA}}{\text{g víscera húmeda}} \right) \left(\frac{100}{62.4} \right) = 30.62 \mu\text{g DA} / \text{g víscera húmeda}$$

Con la metodología establecida se pudo determinar que la neurotóxina se encuentra en una concentración de 30.62 $\mu\text{g DA/g}$, esto considerando el porcentaje de recuperación especificado anteriormente (62.4%), evitando así una subestimación de la concentración.

Por otro lado, si comparamos el valor obtenido con el valor límite establecido en la NOM-032-SSA1-1993 (20 $\mu\text{g DA/g}$) se puede determinar que la muestra analizada no es apta para consumo humano. Sin embargo, como sabemos las vísceras no son normalmente consumidas por las personas, por lo que se considera que lo ideal sería haber analizado toda la sardina, para verificar si el producto es o no apto para consumo humano. Sin embargo, existen animales acuáticos carnívoros o algunas aves que si consumen todo el pez, lo que podría originar una bioacumulación de DA en los mismos y provocar su muerte por intoxicación, como ya fue discutido en el marco teórico en el punto 2.4.

4.7.2 Cuantificación de DA en la muestra A1

En los cromatogramas correspondientes a la muestra A1 no se observó algún pico en el tiempo de retención del DA (Ver cromatograma A10 del apéndice). Por lo tanto la cantidad de DA contenida en las muestras no fue posible detectarla con la metodología establecida.

En la tabla 15 se muestran los datos para la determinación de la concentración de DA en la muestra A1. Es importante mencionar que en el caso de la muestra A1 se corrió directamente el sobrenadante ya filtrado obtenido a partir de la centrifugación y no se realizó ninguna dilución, con el fin de ver si se podía detectar DA; sin embargo, no se registró ninguna señal.

Tabla 14. Características de la muestra A1.

Peso de la muestra (vísceras secas) (g)	%Humedad	Volumen de aforo con HCl (mL)	µg DA/g muestra húmeda (sin considerar % de recuperación)	µg DA/g muestra húmeda (real)
3.836	75.45	30	<2.40	<3.85

Por lo tanto, con los resultados obtenidos solo se logró determinar que la muestra tiene menos de 3.85 µg DA/g muestra; sin embargo, no fue posible determinar la cantidad exacta debido a que su concentración es menor al límite de detección establecido.

El cálculo se realizó considerando que, de acuerdo a la curva de la relación lineal se determinó que la concentración menor a detectarse es de 1.25 ng DA/ μ L. Los cálculos se muestran a continuación:

$$\left(\frac{1.25 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \right) \left(\frac{1 \mu\text{L}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \mu\text{g}}{1000 \text{ ng}} \right) = 1.25 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\left(\frac{1.25 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \left(\frac{30 \text{ mLaforo}}{3.836 \text{ g vísceras sec as}} \right) = 9.78 \mu\text{g} / \text{g vísceras sec as}$$

$$\left(\frac{9.78 \mu\text{g}}{\text{g vísceras sec as}} \right) \left(\frac{24.55 \text{ g víscera seca}}{100 \text{ g víscera humeda}} \right) = 2.40 \mu\text{g} / \text{g víscera humeda}$$

Considerando el % de recuperación :

$$\left(\frac{2.40 \mu\text{gDA}}{\text{g víscera humeda}} \right) \left(\frac{100}{62.4} \right) = 3.85 \mu\text{g} / \text{g víscera humeda}$$

4.7.3 Cuantificación de DA en la muestra A2

En el caso de la muestra A2 tampoco se pudo detectar el DA bajo las condiciones trabajadas. Uno de los cromatogramas obtenidos se muestra en la sección del Apéndice (A11). De esta forma al igual que en la muestra A1 solo se pudo determinar el valor por debajo del cual se encontraba la concentración de DA en la muestra (<4.76 μ g DA/g muestra húmeda). En la tabla 15 se muestra dicho valor.

Los cálculos se realizaron de la misma forma que para la muestra A1, considerando como máximo el valor más bajo en la curva de la relación lineal entre área bajo la curva y concentración.

Tabla 15. Características de la muestra A2.

Peso de la muestra (vísceras secas) (g)	%Humedad	Volumen de aforo con HCl (mL)	µg DA/g muestra húmeda (sin considerar % de recuperación)	µg DA/g muestra húmeda (real)
2.5954	75.35	25	<2.97	<4.76

4.7.4 Comparación de resultados

Se compararon los resultados obtenidos con los proporcionados por el CICESE, de las muestras que fueron proporcionadas, dicha comparación se puede observar en la tabla 16.

Tabla 16. Comparación entre las concentraciones obtenidas en la Facultad de Química y en el CICESE.

Muestra	Concentración (µg DA/g víscera húmeda)	
	Facultad de Química, UNAM	CICESE
SQA2	30.45 ±2.41	81.83
A1	<3.85	38.12
A2	<4.76	31.23

Como se puede observar en la tabla 16 los valores obtenidos por el CICESE son mayores que en el caso de los obtenidos en la Facultad de Química de la UNAM, la diferencia se puede atribuir en primer lugar al momento de la determinación, ya que en el CICESE la realizaron en fresco, en Diciembre del 2007, por lo tanto con un periodo corto de almacenamiento, posteriormente la muestra fue liofilizada y enviada a la Facultad de Química, en donde transcurrió más tiempo almacenada antes ser analizada. De acuerdo a las fechas de recolección, para las muestras A1 y A2 pasó un año y medio y medio año respectivamente para la cuantificación de DA.

Con esto podemos corroborar la información que establece la baja estabilidad del ácido domóico y su degradación con el paso del tiempo, no obstante a cuidar factores como la temperatura de almacenamiento y evitar el contacto del DA con la luz. En el desarrollo de este trabajo se observó que aún cuando la muestra se encuentra liofilizada (en ausencia de agua en la muestra) probablemente el DA sigue siendo sensible a su degradación, ya que después de algún tiempo solamente se conservó el 37.2% del DA original, por lo tanto ocurrió una degradación del 62.8% del mismo.



CONCLUSIONES

-
-
- No hay interferencia por parte del triptofano para la cuantificación de ácido domóico, pues presentan una diferencia de más de 2 minutos en sus tiempos de retención bajo las condiciones establecidas en la metodología; además, existe precisión en la determinación de ácido domóico (CV <1%).
 - Hay una linealidad entre el área bajo la curva y la concentración del ácido domóico, para concentraciones de dicho compuesto entre 1.25 a 25 ng/μL, siendo el límite de detección de 1.25ng/μL.
 - Se encontró que si existe reproducibilidad en la cuantificación de DA por HPLC, bajo las condiciones trabajadas.
 - Realizando el proceso de extracción recomendado, no se observó interferencia con ningún otro compuesto para la cuantificación de ácido domóico en mejillones, vísceras y músculo de sardina.
 - Se determinó que el porcentaje de recuperación de DA bajo las condiciones trabajadas es de 62.4% y con este valor es posible obtener un valor con menor error evitando las subestimaciones de la concentración de DA en la muestra analizada.
 - Se logró cuantificar DA en las muestras proporcionadas por el CICESE, encontrándose solo la SQA2 como positiva a DA, bajo las condiciones trabajadas. La concentración de DA en SQA2 fue de 30.62 ± 2.41 μg DA/g muestra.

-
-
- El DA en muestras liofilizadas se degrada con el tiempo aún cuidando factores de conservación como la temperatura y evitar el paso de la luz a la muestra.
 - Se logró el objetivo de implementar el método por HPLC para cuantificar DA en la Facultad de Química, UNAM.

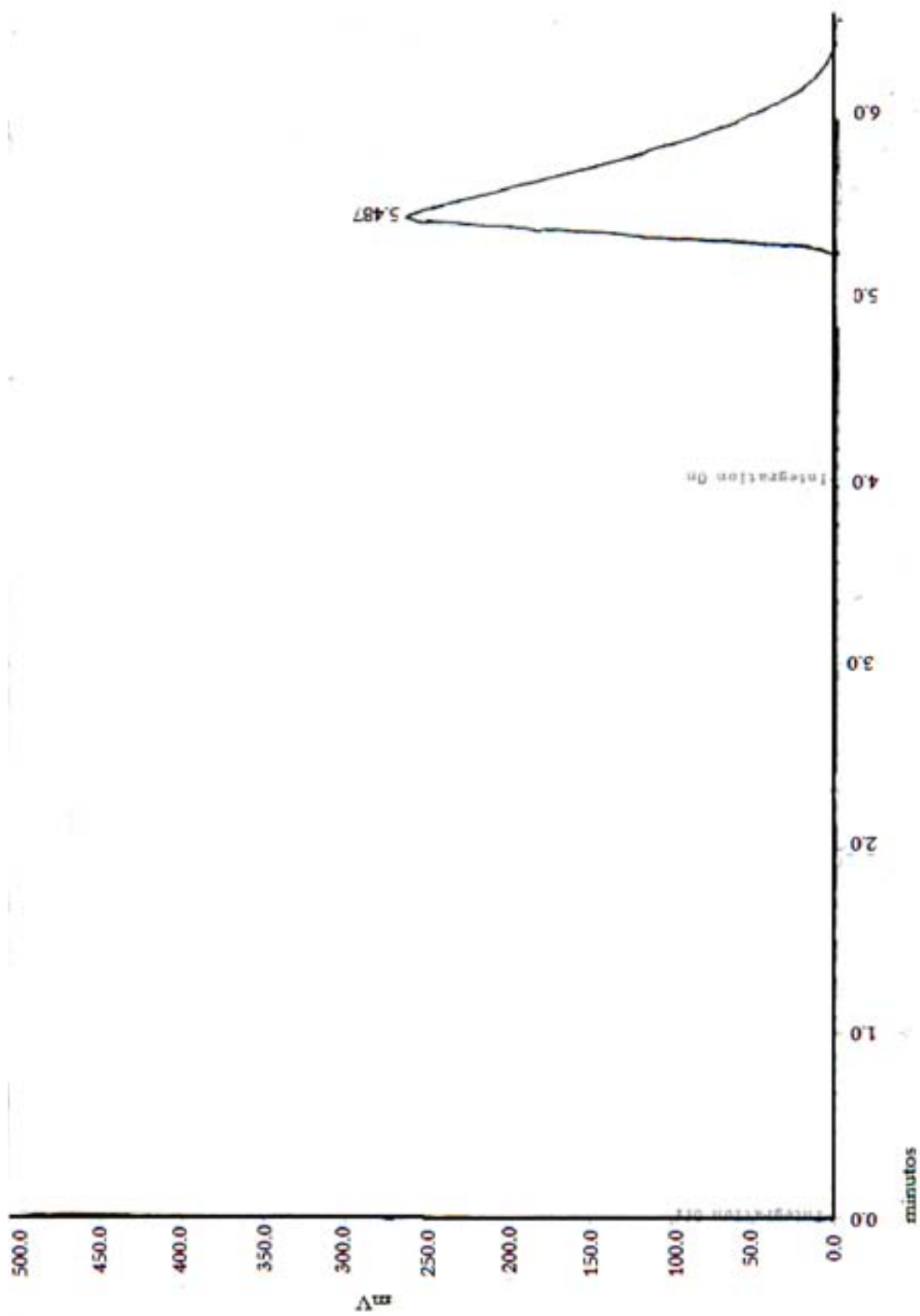
BIBLIOGRAFÍA

-
-
- BOTANA, L. M.; SEAFOOD AND FRESH WATER TOXINS (Pharmacology, physiology and detection); Marcel Dekker, Inc.; New York, 2000. Pp. 35-350, 283-396.
- CORTES, R. A.; LAS MAREAS ROJAS; AGT EDITOR, S.A.; México, D.F., 1998. Pág. 2-5, 91-92, 110-112, 119-121.
- DOUGLAS, D. J.; Kenchington, E. R.; Bird, C. J.; Pocklington, R.; Bradford, B. ; Silvert, W.; Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magallanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo nitzschia multiseries*; Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54(4); (1997): 907–913.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Marine Biotoxins; Food and Nutrition Paper; 4. Roma, 2004. Pág. 97-135.
- FRITZ, L; Quilliam, M. A.; Wright, J. L. C.; Beale, A. M.; Work, T. M.; “An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. J. Phycol. (1992), 28: 439-442.
- HALLEGRAEFF, G. M.; A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 1993; 32:79-99.
- HARWITZ, W.; OFICIAL METHODS OF ANÁLISIS OF AOAC INTERNATIONAL; 17th edition; AOAC International; Gaithersburg, 2000. Volumen II (49): 59-61.
- INVERSON, F.; Truelove, J.; Tryphonas, L; Nera, E. A.; The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates. Canada Diseases Weekly Report, 1990. 16S1E: 15-20.
- INVERSON, F.; Truelove, J.; Toxicology and seafood toxins: domoic acid; Natural toxins, 2, (1994): 334-339.
- MILLER, J. C.; Miller, J. N.; ESTADÍSTICA PARA QUÍMICA ANALÍTICA, Segunda edición; Addison-Wesley Iberoamericana; 1993. Pág. 44-46, 49-5.
- PERL, T. M.; Bedard, L.; Kotsatsky, T.; Hockin, J. C.; Tood, E.C.D.; Remis, M.D.; An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. N. Eng. J. Med, (1990). 322: 1775-1780.

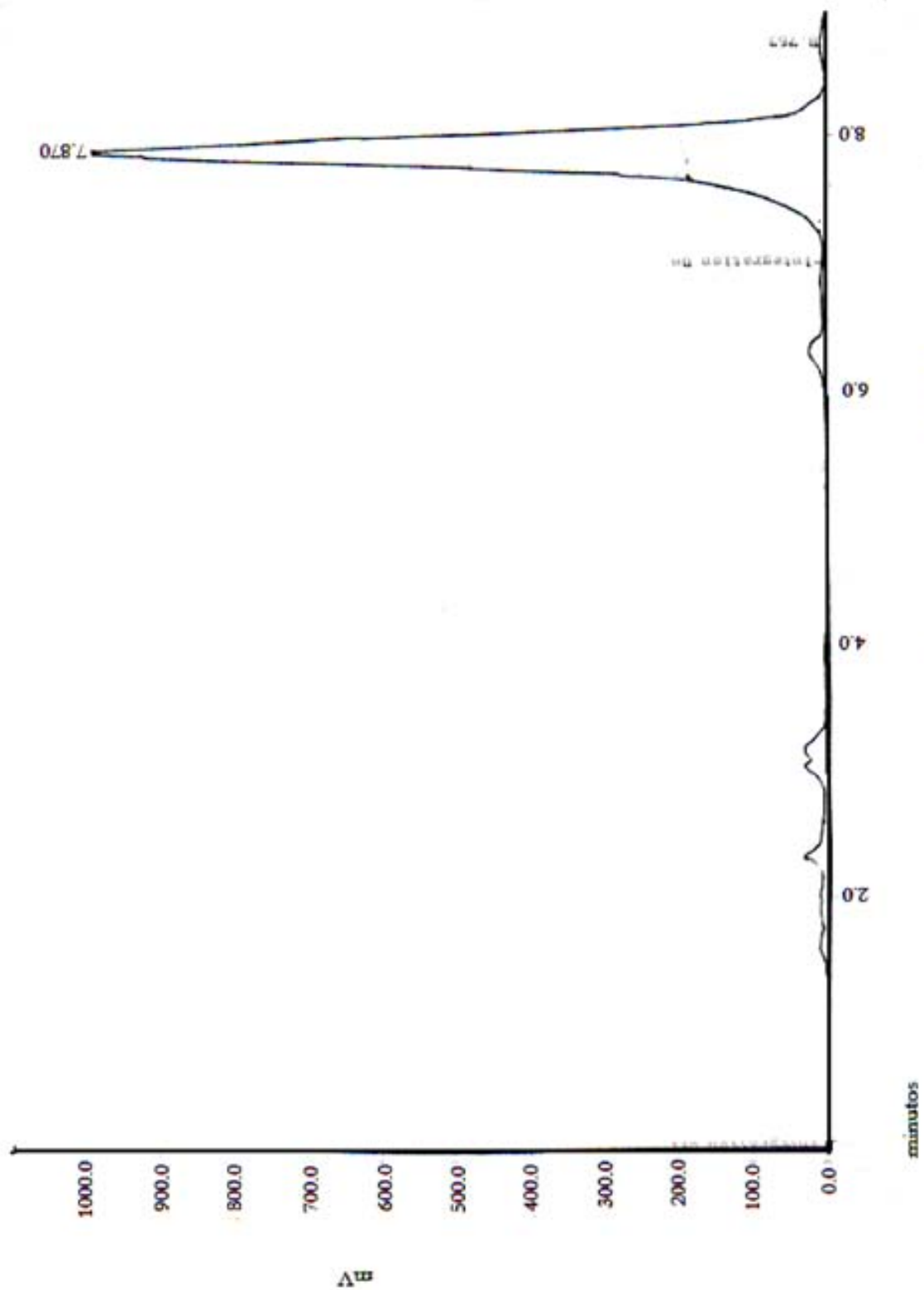
-
-
- PÉREZ, R. C.; Validación de la Metodología para la determinación de Ácido Domóico (BIOTOXINA ASP) en Moluscos Bivalvos por HPLC. Rev. Perú Medicina Experimental Salud Publica, Septiembre, 2002.19 (3),: 142-146.
- PRESTON, E.; Hynie, I.; Transfer constants for blood brain barrier permeation of neuroexcitatory shellfish toxin, domoic acid. Canadian J. Neurol. Sci., (1991), 18: 211-214.
- QUILLIAM, M.A.; Sim, P.G.; Mcculloch, A.W.; Mcinnes, A.G.; High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton; Int. J. Environ. Analyt. Chem.; (1989). 36 :139-154.
- SECRETARIA DE SALUD. NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-031-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, 6 de Marzo de 1995. México. Pág. 4-31.
- SIERRA-BELTRAN, A.; Palafox-Urbe, M.; Grajales-Montiel, L.; Cruz-Villacorta, A.; y Ochoa, J.L. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, México: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. Toxicol.; 1997. 35 : 447-453.
- SUAREZ, B.; Guzmán, L.; Floraciones de Algas Nocivas; Serie Orientaciones en ciencias, Tecnología y Cultura, Editorial Universitaria, México, DF. 1999.
- SUBBA RAO, D.V; Quilliam, M.A.; Pocklington, R.; Domoic acid – a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci, 1998, 45: 2076-2079.
- SUZUKI, C. A. M.; Hierlihy, S. L. Renal clearance of domoic acid in the rat; Food Chemical Toxicol., 1993; 31: 710-716.
- TEITELBAUM, J.S.; Zatorre, R.J.; Carpenter, S.; Gendron, D.; EVANS, A.C.; Gjedde, A.; Cashman, N. R.; Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. N. Engl. J. Med. 1990; 322 : 1781-1787.
- TRUELOVE, J.; Iverson, F; Serum domoic acid clearance and clinical observations in he cynomolgus monkey and Sprague-Dawley rat following a single IV dose; Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1994. 52 : 476-486.

-
-
- VILLAC, M.C.; Roelke, D.V.; Villareal, T.A.; Fryxell, G.A.; Comparison of two domoic acid-producing diatoms: a review. Hidrobiología; 1993. 269/270: 213-224.
- WALTER, J.A.; Falk, M.; Wright, J.L.C.; Chemistry of the shellfish toxin domoic acid: characterization of related compounds; Can. J. Chem., 1994. 72: 430-436.
- WORK, T.M.,; Barr, B.; Beale, A.M.; Fritz, L.; Quilliam, M.A.; Wright, J.L.C.; Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California; J. Zoo Wildlife Medicine, 1993. 24, 54-62.
- WRIGHT, J.L.C.; Falk, M.; McInnes, A.G.; Walter, J.A. Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels; Can. J. Chem.; 1990. 68: 22-25.
- WRIGHT, J.L.C; Quilliam, M. A.; "Methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisons". MANUAL OF HARMFUL MARINE MICROALGAE; Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. UNESCO, 1995. Pp. 113-133 y 355-364.

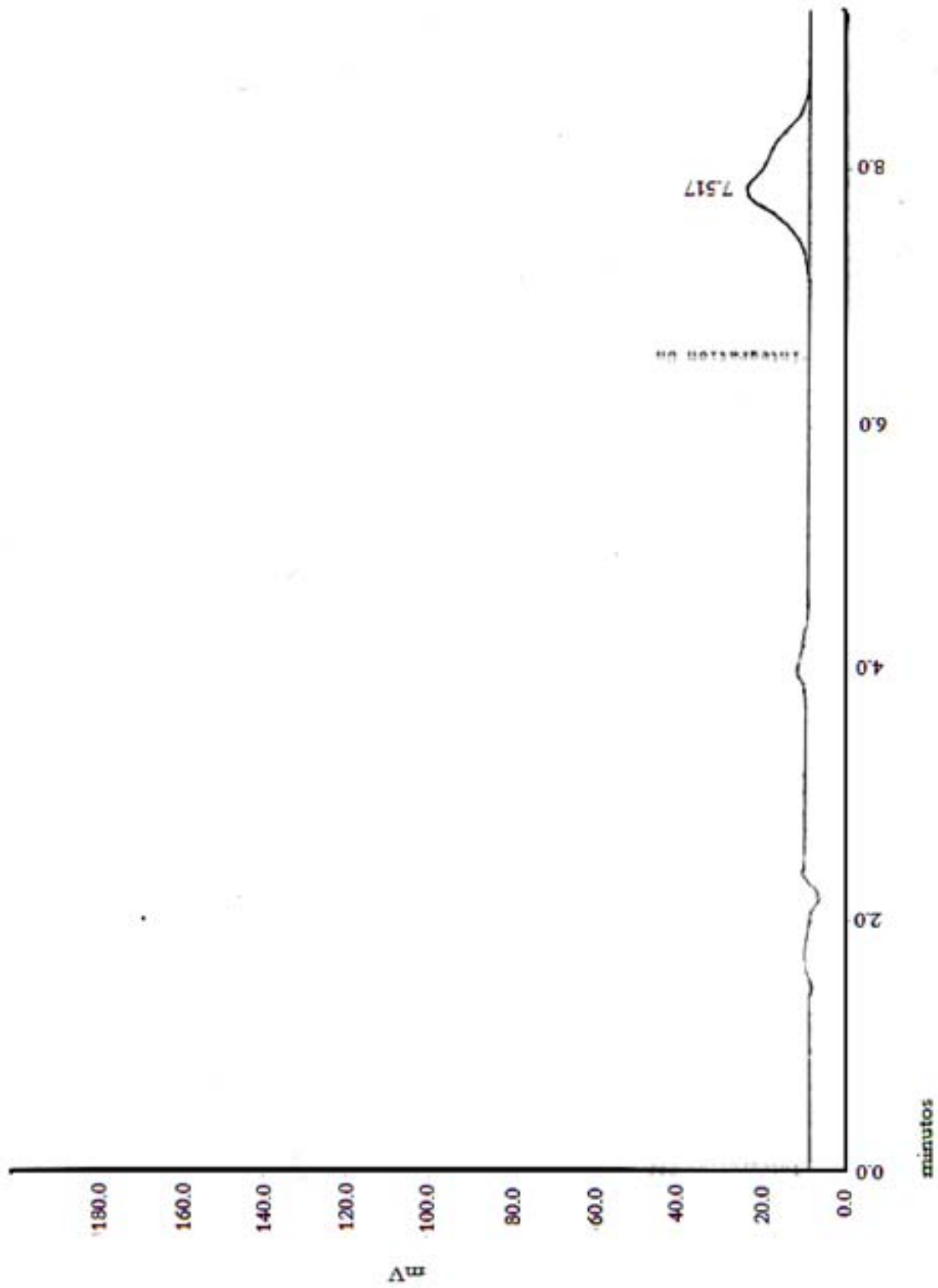
APÉNDICE



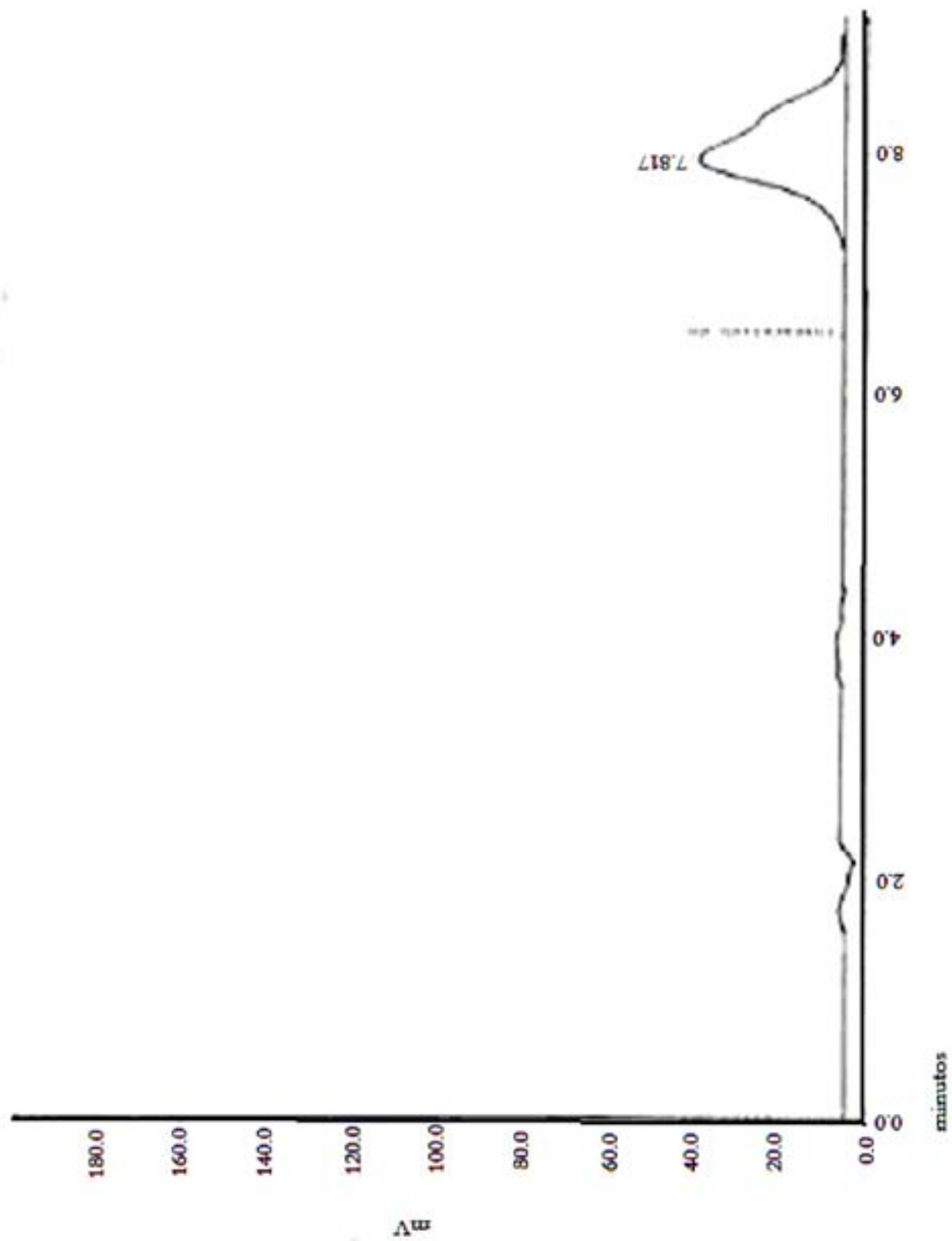
A1. Cromatograma obtenido para determinar el tiempo de retención del triptofano.



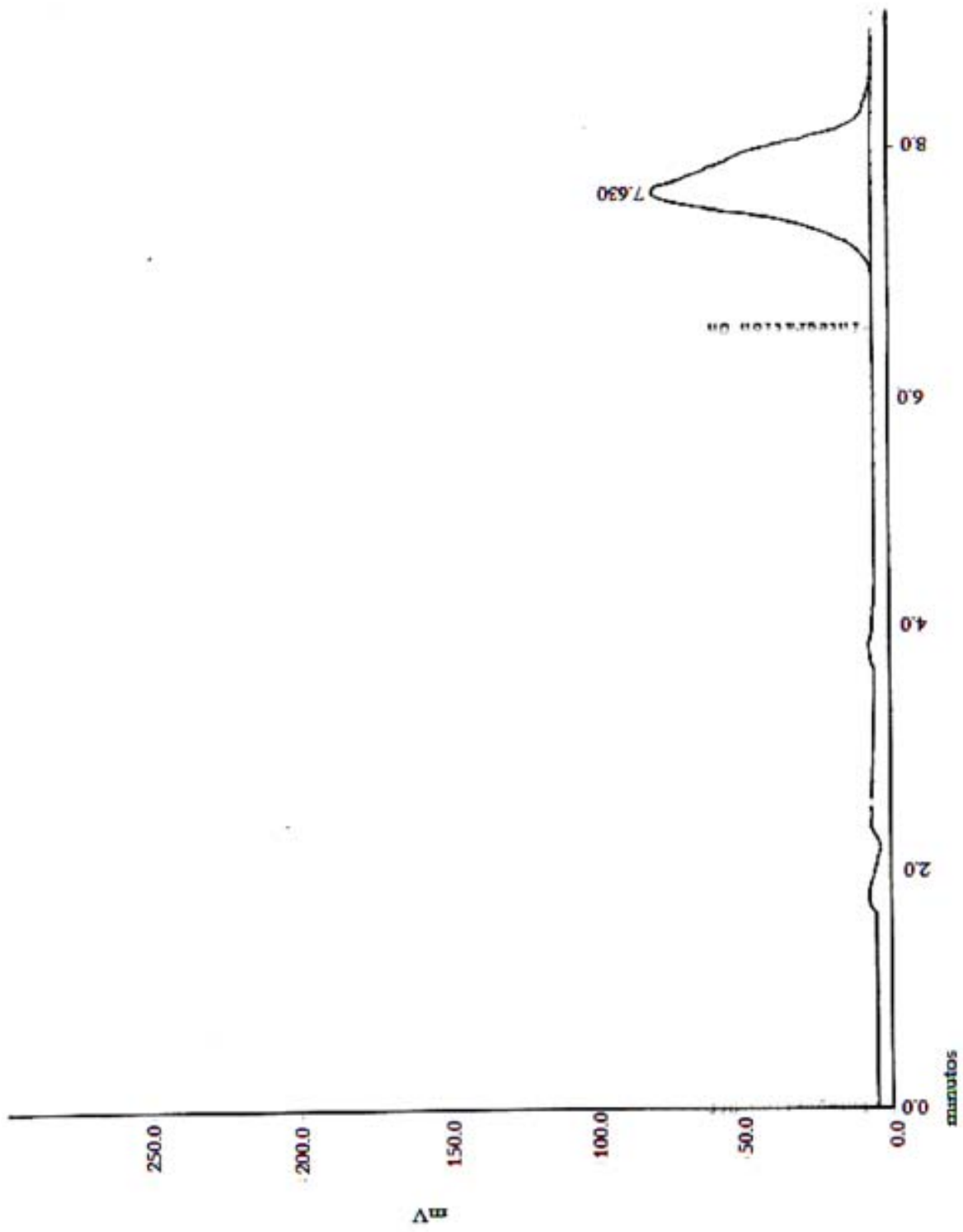
A2. Cromatograma que muestra el tiempo de retención del Ácido domóico.



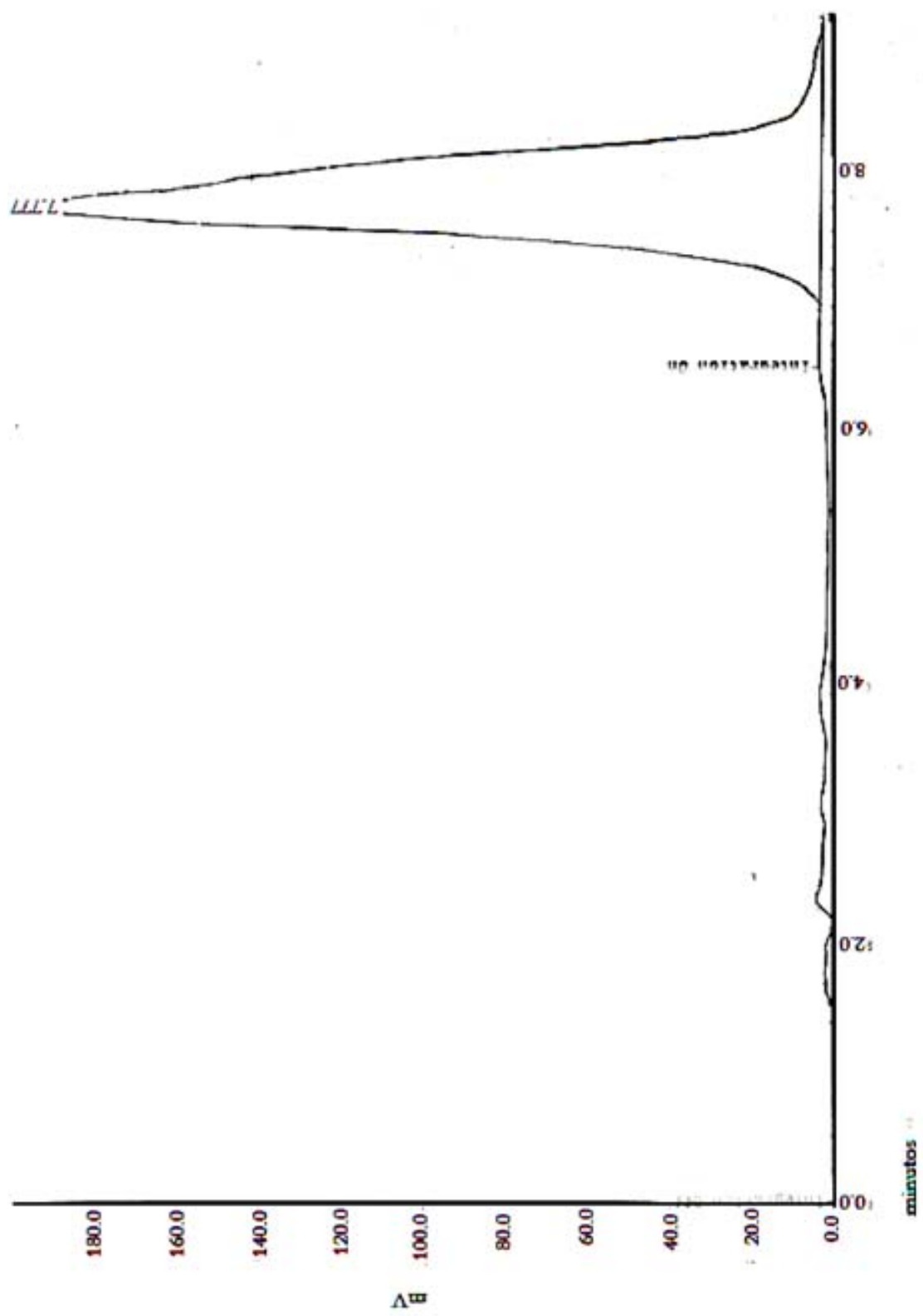
A3. Cromatograma correspondiente a una disolución de DA con concentración de 1.25ng/ μ L.



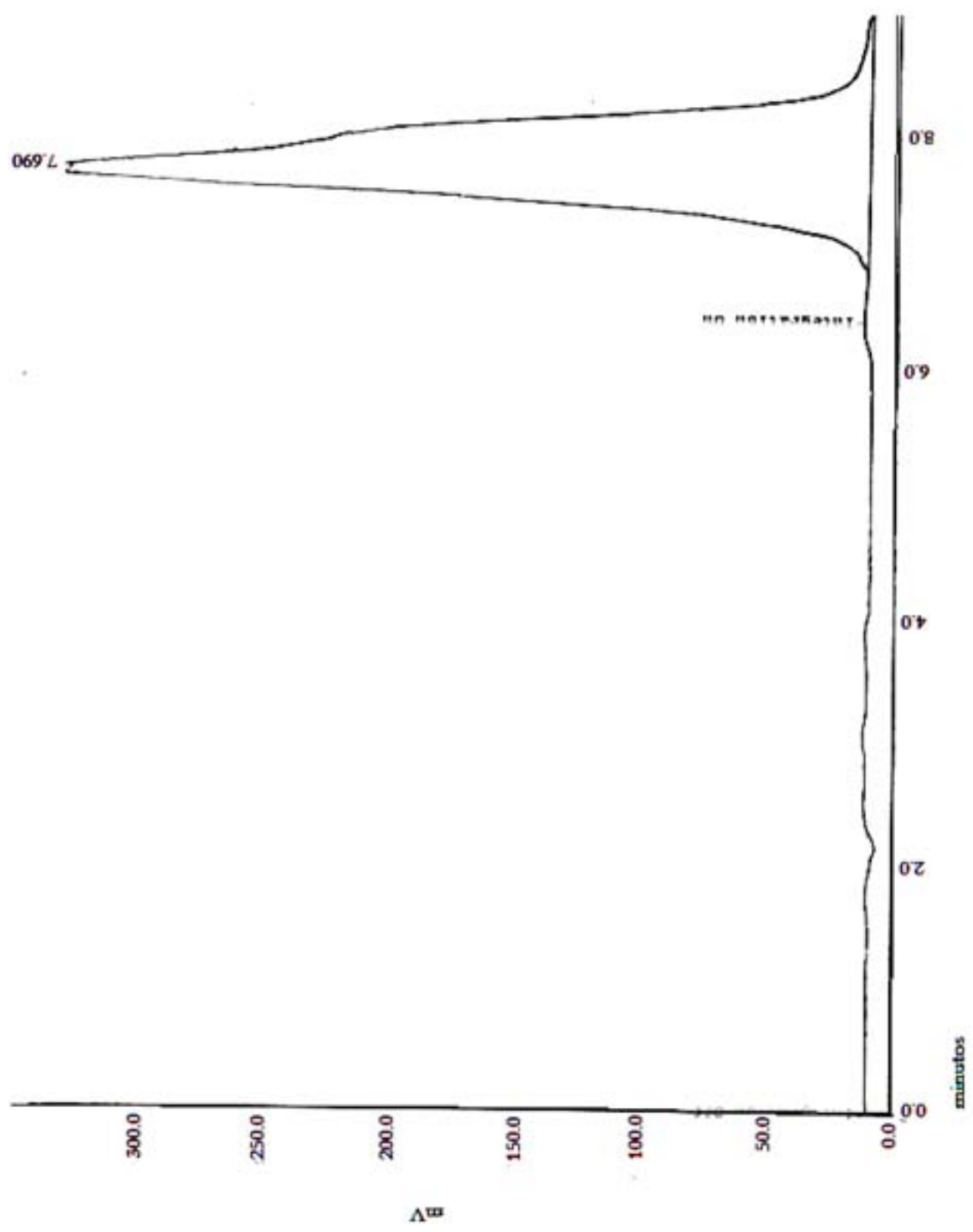
A4. Cromatograma correspondiente a una disolución de DA con concentración de 2.5ng DA/ μ L.



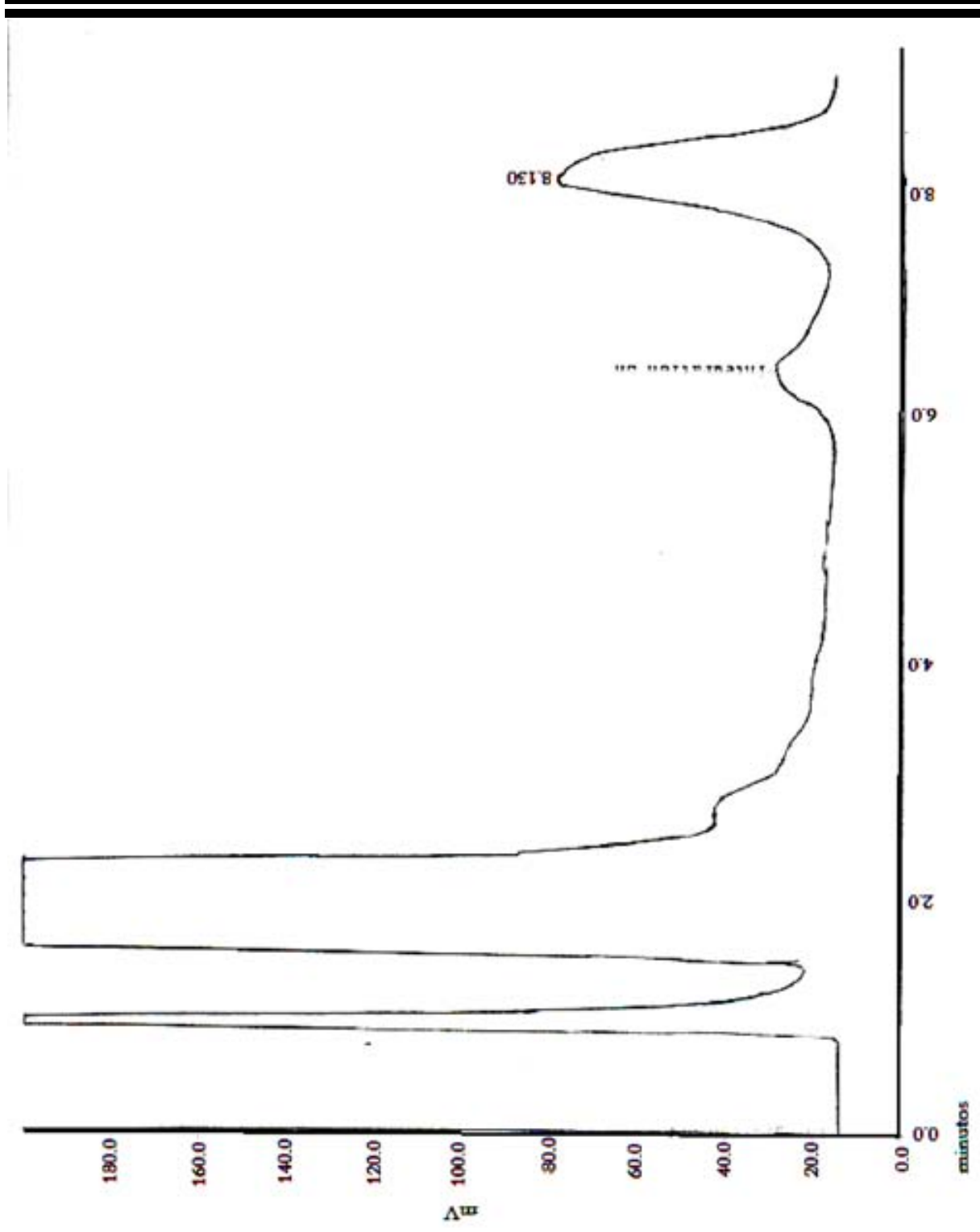
A5. Cromatograma correspondiente a una disolución de DA con concentración de 5ngDA/ μ L.



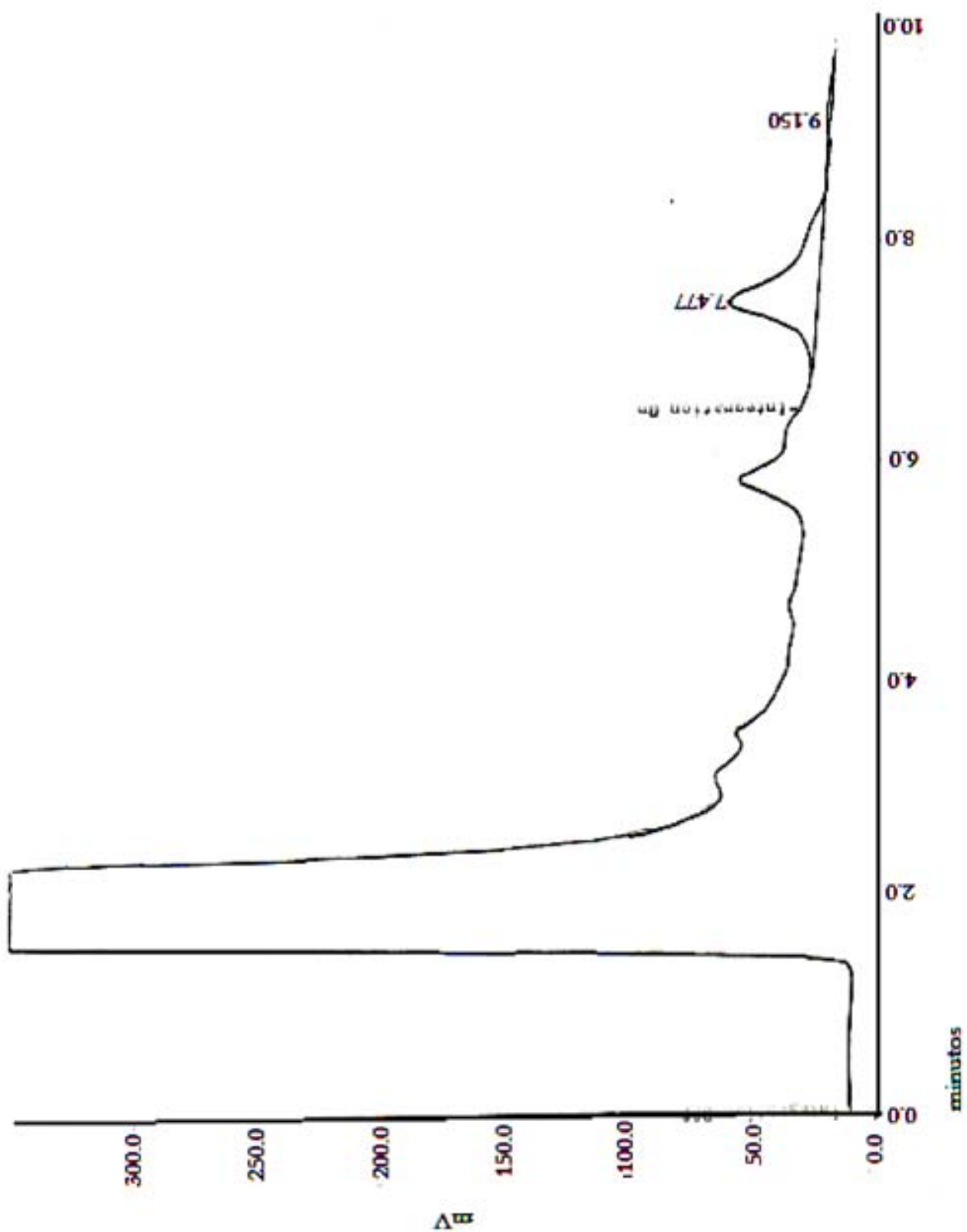
A6. Cromatograma correspondiente a una disolución de DA con concentración de 12.5ng/μL



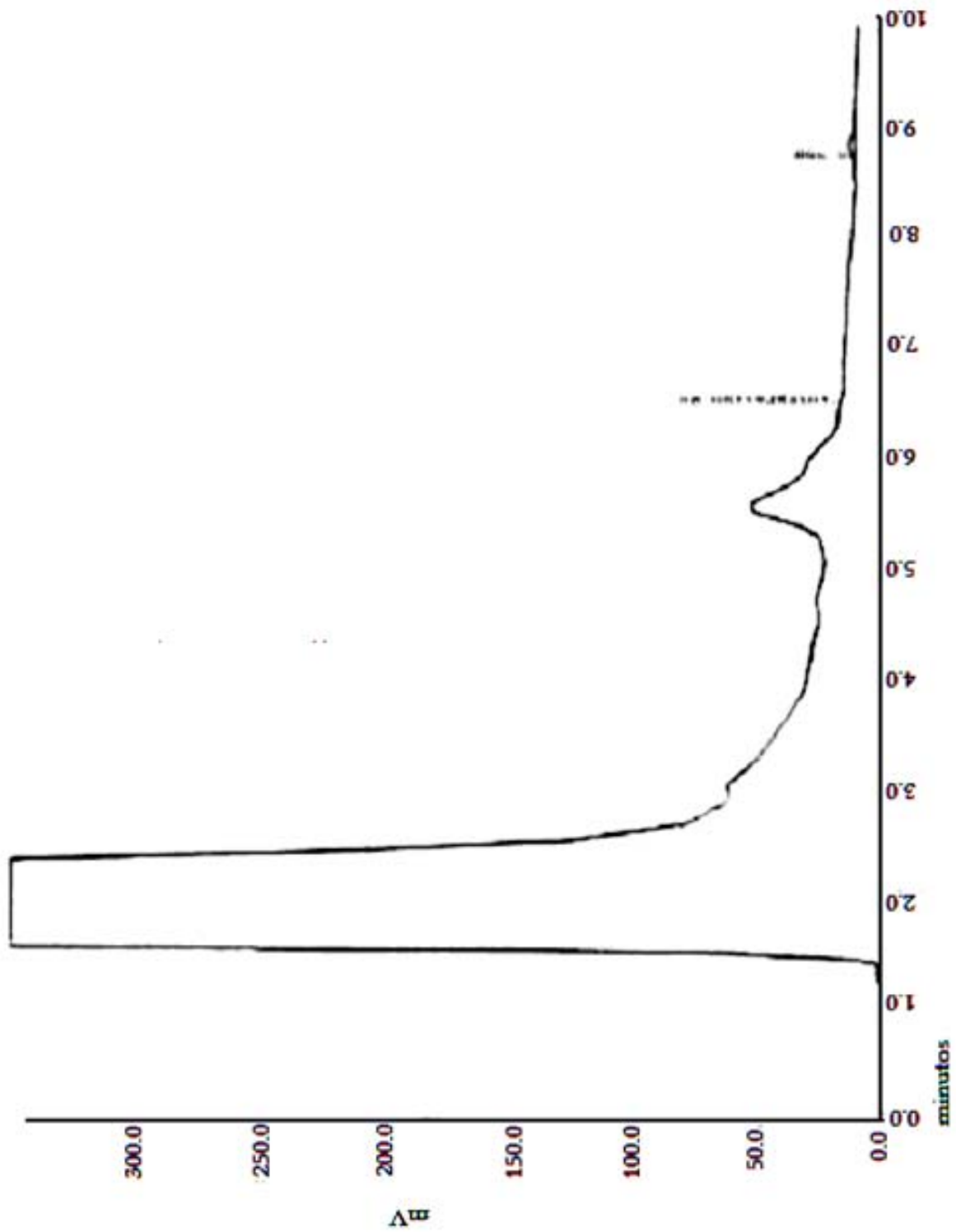
A7. Cromatograma correspondiente a una disolución de DA con concentración de 25ng/ μ L.



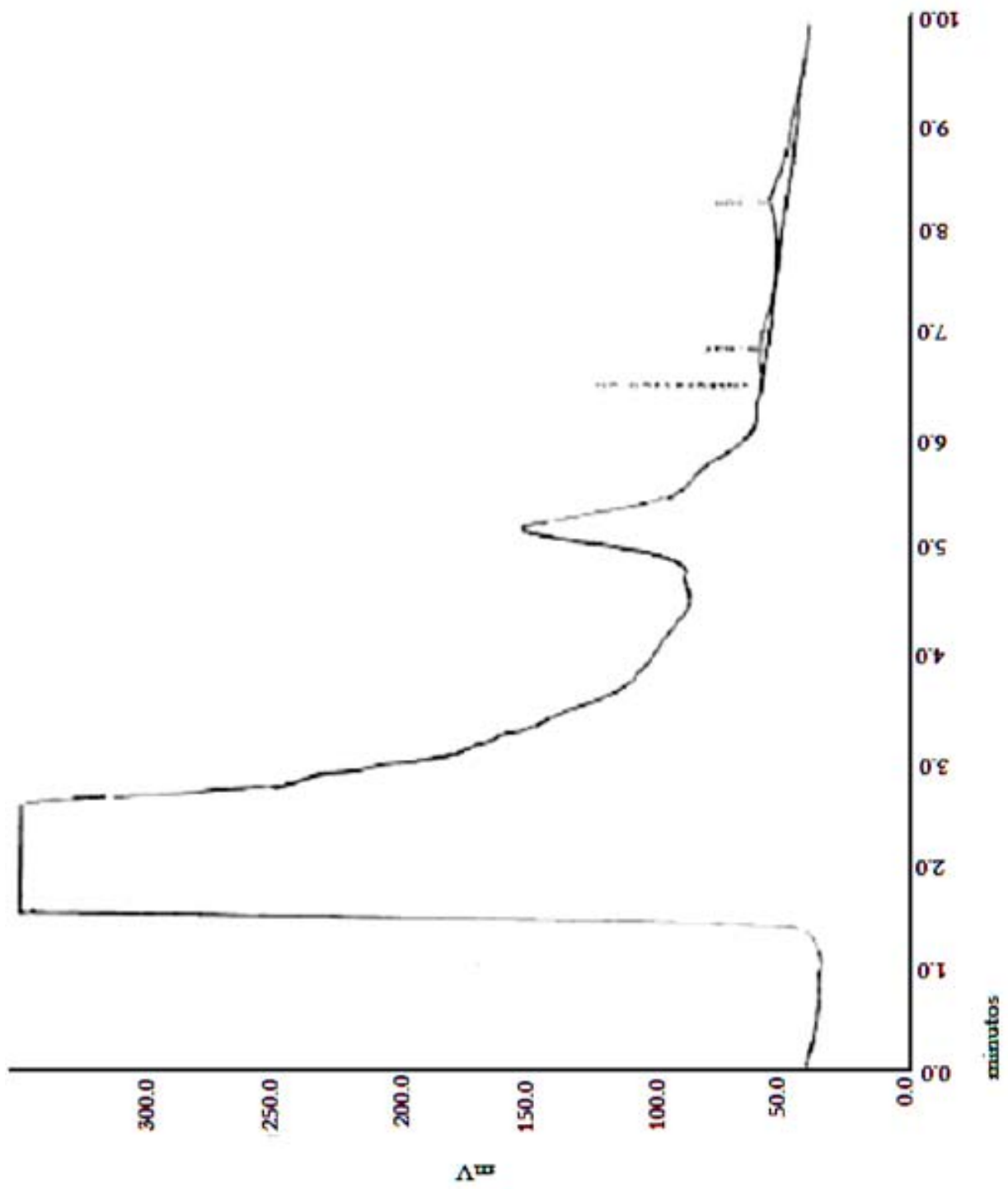
A8. Cromatograma obtenido para la determinación del % de recuperación de DA.



A9. Cromatograma obtenido para la muestra SQA2.



A10. Cromatograma obtenido para la muestra A1.



A11. Cromatograma obtenido para la muestra A2.