

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

Toxinas lipofílicas presentes en *Argopecten purpuratus*  
(concha de abanico) de la bahía  
Samanco - Ancash, Perú

TESIS

Presentada por:

Bach. Martín Diego Gálvez Pilco

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2020

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS No. 322

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 09:00 horas del día 27 de diciembre del 2018, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad No. 9244-2018- FACI/UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

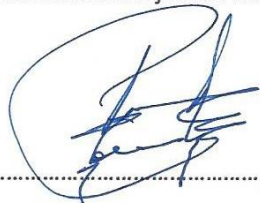
Dr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA	Presidente
Dr. CESAR AUGUSTO CEVALLOS COLUMBUS	Miembro
MSc. ANGELA VERONICA CHOQUE MIRANDA	Secretaria

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura a Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó a el Bachiller: Martín Diego Gálvez Pilco, a exponer la tesis titulada: Toxinas lipofílicas presentes en *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) de la bahía Samanco-Ancash, Perú

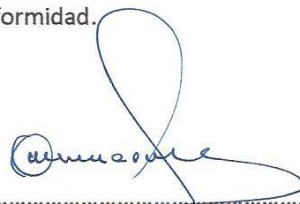
Siendo las 09:50 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del Jurado calificador. Terminado este proceso, se invito a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad, con el calificativo de Sobresaliente (17), de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 10:45 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Dr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA

PRESIDENTE



Dr. CESAR AUGUSTO CEVALLOS COLUMBUS

MIEMBRO



MSc. ANGELA VERONICA CHOQUE MIRANDA

SECRETARIA

**DEDICATORIA:**

*Este trabajo va  
dedicado a mi familia.*

## AGRADECIMIENTOS

Primero me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi co-asesora de tesis, la supervisora del área de instrumentación **Qco. Karina Maribel Rondón Rivadeneyra**, quien me permitió realizar esta tesis en Certificaciones del Perú S.A.

A mi asesor de tesis **Dr. César Julio Cáceda Quiroz**, por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo.

A mis profesores de la escuela de Biología -Microbiología, por sus enseñanzas, su metodología y por su disposición e incentivo continuo en mi formación como profesional, muchas gracias.

Finalmente, agradezco a las personas que de alguna u otra manera me apoyaron y estuvieron presentes de alguna forma en el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN	
ABSTRACT	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema .....	1
1.2 Justificación e importancia de la investigación.....	4
1.3 Objetivo general .....	4
1.4 Objetivos específicos .....	5
1.5 Hipótesis .....	5
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
2.1 <i>Argopecten purpuratus</i> (Concha de abanico) .....	6
2.1.1 Aspectos Reproductivos.....	8
2.1.2 Explotación y cultivo de la concha de abanico .....	12
2.1.3 Abastecimiento de semilla.....	13
2.1.4 Etapa de engorde.....	15
2.1.5 Comercialización .....	17
2.2 Bahía de Samanco-Ancash .....	18
2.3 Floraciones algales .....	27
2.4 Toxinas marinas.....	31
2.4.1 Toxinas lipofílicas diarreogénicas.....	33

2.4.1.1	Grupo del ácido okadaico .....	33
2.4.1.1.1	Estructura química y análogos .....	35
2.4.1.1.2	Mecanismo de acción.....	36
2.4.1.1.3	Distribución y organismos productores.....	38
2.4.1.2	Grupo de los Azaspirácidos.....	39
2.4.1.2.1	Estructura química y análogos .....	40
2.4.1.2.2	Mecanismo de acción.....	41
2.4.1.2.3	Distribución y organismos productores.....	43
2.4.2	Toxinas lipofílicas no diarreogénicas.....	44
2.4.2.1	Grupo de las Yesotoxinas.....	44
2.4.2.2	Grupo de las Pectenotoxinas.....	60
2.5	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas .....	66
2.5.1	Cromatografía líquida .....	66
2.5.2	Espectrometría de masas.....	71
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
3.1	Material biológico .....	76
3.2	Metodología .....	76
3.2.1	Preparación de la muestra .....	77
3.2.2	Procedimiento de extracción .....	77
3.2.3	Análisis de toxinas libres de los grupos OA, PTX, AZA y YTX.....	78
3.2.4	Hidrólisis.....	78

3.2.5	Curva de calibración.....	79
3.2.6	Condiciones cromatográficas .....	80
3.2.7	Detección por espectrometría de masas .....	81
3.2.9	Expresión de los resultados .....	87
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>89</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>113</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>121</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>122</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>124</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>164</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Curva de calibración.....	79
<b>Cuadro 2.</b> Condiciones cromatográficas.....	81
<b>Cuadro 3.</b> Iones precursores e hijos de las toxinas lipofílicas.....	83
<b>Cuadro 4.</b> Parámetros de optimización en modo positivo.....	84
<b>Cuadro 5.</b> Parámetros de optimización en modo negativo.....	85
<b>Cuadro 6.</b> TEFs adoptado por EFSA para toxinas lipofílicas reguladas.	87
<b>Cuadro 7.</b> Codificación y peso de las muestras analizadas.....	89
<b>Cuadro 8.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de enero 2015, Bahía Samanco-Ancash.....	92
<b>Cuadro 9.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Febrero 2015, Bahía Samanco-Ancash .....	93
<b>Cuadro 10.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Marzo 2015, Bahía Samanco-Ancash.....	94

<b>Cuadro 11.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Abril	
2015, Bahía Samanco-Ancash.....	95
<b>Cuadro 12.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Mayo	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	96
<b>Cuadro 13.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Junio	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	97
<b>Cuadro 14.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Julio	
2015, Bahía Samanco-Ancash.....	98
<b>Cuadro 15.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Agosto	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	99
<b>Cuadro 16.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de	
Setiembre 2015, Bahía Samanco-Ancash .....	100
<b>Cuadro 17.</b> Resultado del análisis de las muestras del mes de Octubre	
2015, Bahía Samanco-Ancash.....	101

<b>Cuadro 18.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Enero	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	102
<b>Cuadro 19.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Febrero	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	103
<b>Cuadro 20.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Marzo	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	104
<b>Cuadro 21.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Abril	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	105
<b>Cuadro 22.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Mayo	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	106
<b>Cuadro 23.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Junio	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	107
<b>Cuadro 24.</b> Cantidad de toxinas por grupo mes de Julio	
2015, Bahía Samanco-Ancash .....	108

**Cuadro 25.** Cantidad de toxinas por grupo mes de Agosto

2015, Bahía Samanco-Ancash .....109

**Cuadro 26.** Cantidad de toxinas por grupo mes de Setiembre

2015, Bahía Samanco-Ancash.....110

**Cuadro 27.** Cantidad de toxinas por grupo mes de Octubre

2015, Bahía Samanco-Ancash .....111

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>A. purpuratus</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Esquema general de la ovogénesis (izquierda) y la espermatogénesis (derecha) en pectínidos.....	11
<b>Figura 3.</b> Región Ancash.....	19
<b>Figura 4.</b> Bahía Samanco.....	20
<b>Figura 5.</b> Areas otorgadas como concesiones para la maricultura.....	23
<b>Figura 6.</b> Rango de concentraciones celulares de microalgas planctónicas tóxicas dentro de los cuales se manifiestan la presencia de toxinas en los bivalvos.....	31
<b>Figura 7.</b> Estructura química del ácido okadaico (OA), dinofisistoxina 1 (DTX1), dinofisistoxina 2 (DTX2) y derivados acilados (DTX3).	36
<b>Figura 8.</b> Estructura química de azaspirácidos 1-5.....	41

<b>Figura 9.</b> Estructura química de una selección de toxinas del grupo de las Yesotoxinas (YTXs).....	53
<b>Figura 10.</b> Estructura de las principales pectenotoxinas (PTXs) y ácidos secoicos de las pectenotoxinas(PTXSA).....	62
<b>Figura 11.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Enero.....	102
<b>Figura 12.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Febrero.....	103
<b>Figura 13.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Marzo.....	104
<b>Figura 14.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Abril.....	105
<b>Figura 15.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Mayo.....	106
<b>Figura 16.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Junio.....	107
<b>Figura 17.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Julio.....	108
<b>Figura 18.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Agosto.....	109
<b>Figura 19.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Setiembre.....	110
<b>Figura 20.</b> Toxinas del grupo de las YTX mes de Octubre.....	111

**Figura 21.** Concentración de toxinas del grupo de las YTX en el

año 2015.....112

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Muestras homogenizadas.....	160
<b>Anexo 2.</b> Pesado de muestras y codificación.....	160
<b>Anexo 3.</b> Ultra turrax .....	161
<b>Anexo 4.</b> Solventes grado LC MS .....	162
<b>Anexo 5.</b> Proceso de extracción.....	162
<b>Anexo 6.</b> Extracto de las muestras.....	163
<b>Anexo 7.</b> Cromatograma del Estándar 1 del grupo Acido Okadaico...	163
<b>Anexo 8.</b> Cromatograma del Estándar 1 del Grupo de las Yesotoxinas.....	164
<b>Anexo 9.</b> Cromatograma del Estándar 1 del grupo de las Pectenotoxinas.....	164
<b>Anexo 10.</b> Cromatograma del Estándar 1 del grupo de los Azaspirácidos.....	165
<b>Anexo 11.</b> Linealidad del Ácido Okadaico.....	165

<b>Anexo 12.</b> Linealidad de la dinofisistoxina 2.....	166
<b>Anexo 13.</b> Linealidad de la dinofisistoxina 1.....	166
<b>Anexo 14.</b> Linealidad de la Yesotoxina y 45-hidroxiyesotoxina.....	166
<b>Anexo 15.</b> Linealidad de la Homoyesotoxina y 45-hidroxihomoyesotoxina.....	167
<b>Anexo 16.</b> Linealidad del Azaspirácidos 1.....	167
<b>Anexo 17.</b> Linealidad del Azaspirácidos 2.....	167
<b>Anexo 18.</b> Linealidad del Azaspirácidos 3.....	168
<b>Anexo 19.</b> Linealidad de la pectenotoxina 2 y 1.....	168
<b>Anexo 20.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-01-24.....	169
<b>Anexo 21.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-01-30.....	171
<b>Anexo 22.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-02-06.....	173
<b>Anexo 23.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-02-13.....	175
<b>Anexo 24.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-02-20.....	177
<b>Anexo 25.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-02-27.....	179

<b>Anexo 26.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-03-05.....	181
<b>Anexo 27.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-03-13.....	183
<b>Anexo 28.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-03-20.....	185
<b>Anexo 29.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-03-28.....	187
<b>Anexo 30.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-03-31.....	189
<b>Anexo 31.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-04-10.....	191
<b>Anexo 32.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-04-27.....	193
<b>Anexo 33.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-04-23.....	195
<b>Anexo 34.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-04-29.....	197
<b>Anexo 35.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-05-08.....	199
<b>Anexo 36.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-05-15.....	201
<b>Anexo 37.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-05-21.....	203
<b>Anexo 38.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-05-28.....	205
<b>Anexo 39.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-06-05.....	207
<b>Anexo 40.</b>	Cromatogramas de la muestra 2015-06-11.....	209

<b>Anexo 41.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-06-18.....	211
<b>Anexo 42.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-06-25.....	213
<b>Anexo 43.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-07-03.....	215
<b>Anexo 44.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-07-09.....	217
<b>Anexo 45.</b> Cromatogramas de la muestra 2017-07-16.....	219
<b>Anexo 46.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-07-24.....	221
<b>Anexo 47.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-07-30.....	223
<b>Anexo 48.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-08-07.....	225
<b>Anexo 49.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-08-14.....	227
<b>Anexo 50.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-08-21.....	229
<b>Anexo 51.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-08-27.....	231
<b>Anexo 52.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-09-03.....	233
<b>Anexo 53.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-09-11.....	235
<b>Anexo 54.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-09-17.....	237
<b>Anexo 55.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-09-25.....	239

<b>Anexo 56.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-10-05.....	241
<b>Anexo 57.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-10-09.....	243
<b>Anexo 58.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-10-16.....	245
<b>Anexo 59.</b> Cromatogramas de la muestra 2015-10-24.....	247
<b>Anexo 60.</b> Equipo LC-MS/MS XEVO TQXS marca WATERS.....	249

## RESUMEN

*Argopecten purpuratus* (concha de abanico) es un recurso hidrobiológico que se encuentre presente en el litoral peruano, este molusco bivalvo presenta un gran valor comercial por lo cual es exportado a diferentes mercados del exterior, siendo el mercado europeo el principal. La Bahía de Samanco es una de las más importantes de la región Ancash, presenta 25 áreas otorgadas como concesiones para la realización de actividades de maricultura. Las floraciones algales nocivas (FAN) son fenómenos producidos por la proliferación de determinadas especies de algas que podría producir toxinas (Toxinas marinas) que al ser el alimento de los moluscos bivalvos son acumuladas en él y podrían llegar al humano. Los objetivos del presente trabajo fueron identificar y cuantificar las toxinas lipofílicas presentes individualmente, así como en grupo de 40 muestras de *Argopecten purpuratus* (conchas de abanico) extraídas de la bahía Samanco-Ancash en el año 2015 que dieron positivo para el método de bioensayo en ratón. De las 13 toxinas legisladas por la Unión Europea, se lograron aislar 2 toxinas del grupo de las Yesotoxinas, la yesotoxina y la homoyesotoxina, el grupo se encontró en concentraciones que varían de 301,37 µg/Kg a 2822,00 µg/Kg.

**Palabras clave:** Floraciones algales, Toxinas marinas, *Argopecten purpuratus*.

## ABSTRACT

*Argopecten purpuratus* (Scallop) is a hydrobiological resource that is present on the Peruvian coast, this bivalve mollusk has a great commercial value and is therefore exported to different markets abroad, being the main European market. Samanco Bay is one of the most important in the Ancash region, it has 25 areas granted as concessions for the performance of mariculture activities. Harmful algal blooms (FAN) are phenomena produced by the proliferation of certain species of algae that could produce toxins (marine toxins) that, being the food of bivalve molluscs, are accumulated in it and could reach humans. The objectives of this work were to identify and quantify the lipophilic toxins present individually, as well as in a group of 40 samples of *Argopecten purpuratus* (Scallops) extracted from the Samanco – Ancash bay in 2015 that tested positive for the bioassay method in mouse. Of the 13 toxins legislated by the European Union, 2 toxins from the group of Yesotoxins, yesotoxin and homoyesotoxin were isolated, the group was found in concentrations that varied from 301,37 µg/Kg to 2822,00 µg/Kg.

**Keyword:** Algal blooms, marine toxins, *Argopecten purpuratus*.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La presencia de biotoxinas en alimentos de origen marino, principalmente en moluscos, representan un grave problema sanitario y económico de extensa incidencia geográfica, y que afecta tanto a países industrializados como a países en desarrollo. La transferencia y acumulación de estas toxinas, producidas por un reducido número de especies de dinoflagelados y diatomeas, tiene lugar a través de las redes tróficas. Los principales vectores de transmisión al hombre son los moluscos bivalvos y, en el caso de la ciguatera, algunas especies de peces de zonas intertropicales. Asimismo, diferentes especies de gasterópodos y crustáceos pueden actuar como transvectores (Cañamero, 2007).

### **1.1 Planteamiento del problema**

Durante las dos últimas décadas, ha aumentado la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las floraciones de algas perjudiciales, así como la de los compuestos tóxicos presentes en la cadena alimentaria marina. Se han ofrecido diferentes explicaciones para esta tendencia, como una mayor concientización 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

eutrofización cultural de aguas domésticas, industriales y de desechos agrícolas, mayor movilidad de las sustancias húmicas y metales trazas desde el suelo por deforestación y/o precipitaciones ácidas (lluvia ácida), y condiciones climáticas poco comunes. Otra posible explicación de la creciente tendencia de aparición de floraciones de algas perjudiciales es el traslado de quistes en reposo de dinoflagelados FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO, 2005).

Prácticamente todos los países de la costa en el mundo se ven afectados por las floraciones de algas nocivas (FAN) (Donald, 2010).

Entre las algas unicelulares productoras de toxinas (dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias), los dinoflagelados son los responsables de la producción de la mayor parte de las toxinas, sin embargo, entre las miles de especies de dinoflagelados conocidas, sólo unas 70 son toxigénicas (Moestrup *et al.* 2004).

La presencia de ficotoxinas en alimentos de origen marino, principalmente en moluscos, representa un grave problema sanitario y económico de extensa incidencia geográfica. Los principales vectores de transmisión son los moluscos bivalvos (mejillones, ostras, etc.). Así mismo, diferentes especies de gasterópodos y crustáceos pueden actuar

como transvectores (Fernandez et al. 2002). El término ficotoxinas indica metabolitos naturales producidos por microalgas unicelulares. (Protistas) (Lawrence y Loreal, 2011)

Para los controles rutinarios de las zonas de extracción a nivel mundial el método utilizado es el Bioensayo en ratón. La muerte de 2 de 3 ratones en menos de 24 horas es interpretada como la presencia de una o más toxinas lipofílicas (ácido okadaico y dinofisistoxinas, pectenotoxinas, yesotoxinas y Azaspirácidos) a niveles superiores a los establecidos por la Unión Europea. Aunque esta asunción es correcta en el caso de los grupos del ácido okadaico (OA), dinofisistoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs) y azaspirácidos (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 3.75 mg equiv. YTXs/kg. (Niveles de 160 µg equiv. YTXs/kg pueden producir la muerte en los ratones). (Fernandez *et al.* 2002)

Por la gran demanda internacional de *Argopecten purpuratus* y las buenas condiciones de producción presentes en la bahía Samanco-Ancash, la ha posicionado como uno de los mejores lugares para la explotación de dicho recurso, se ve la necesidad de conocer los grupos de toxinas lipofílicas presentes y conocer las concentraciones de las

mismas con el fin de obtener datos históricos sobre acontecimientos tóxicos en nuestro litoral.

Por lo que se plantea el siguiente problema:

¿Qué grupos de toxinas lipofílicas y en qué concentraciones se podrán encontrar en *Argopecten purpuratus* de la bahía de Samanco-Ancash?

## **1.2 Justificación e importancia de la investigación**

El presente trabajo se enmarca en el aporte al conocimiento de las toxinas lipofílicas y las concentraciones presentes en muestras de *Argopecten purpuratus* extraídos de la bahía Samanco-Ancash en el año 2015. Estas muestras fueron en su momento analizadas por bioensayo en ratón dando resultados positivos, los síntomas observados en los ratones hacen sospechar la presencia de toxinas lipofílicas pertenecientes al grupo de las Yesotoxinas.

## **1.3 Objetivo general**

Evaluar las toxinas lipofílicas tanto individuales como por grupo, así como las concentraciones presentes en *Argopecten purpuratus* de la bahía de Samanco-Ancash.

#### **1.4 Objetivos específicos**

- a) Identificar las toxinas lipofílicas presentes en *Argopecten purpuratus* de la bahía de Samanco-Ancash.
- b) Cuantificar las toxinas lipofílicas presentes en *Argopecten purpuratus* de la bahía de Samanco-Ancash.
- c) Cuantificar los grupos de toxinas lipofílicas presentes en *Argopecten purpuratus* de la bahía de Samanco-Ancash.

#### **1.5 Hipótesis**

Se encuentran toxinas lipofílicas del grupo de las Yesotoxinas en concentraciones mayores a 160 µg/Kg.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico)

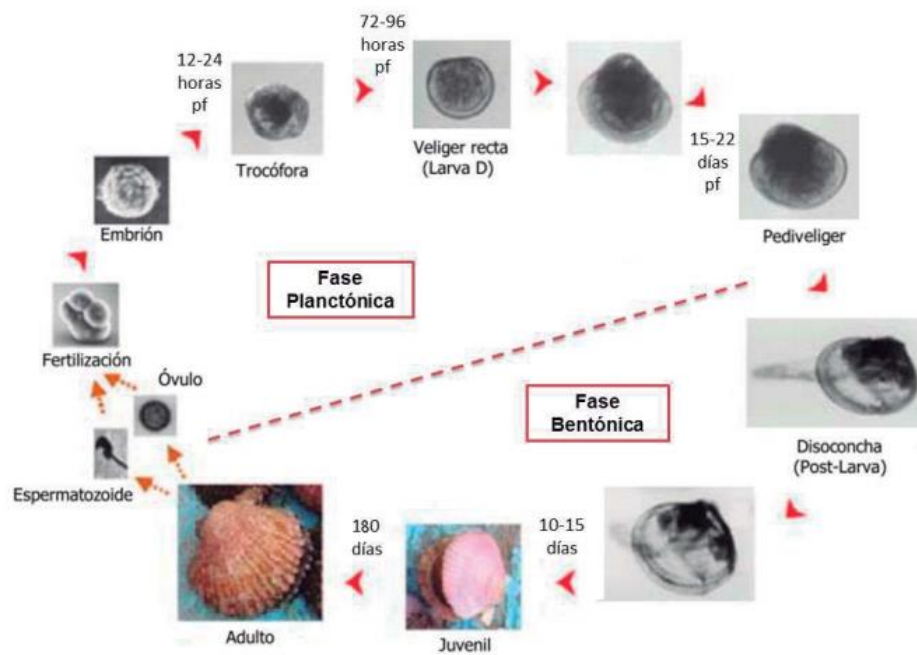
*Argopecten purpuratus* (concha de abanico) es un filtrador de partículas en suspensión (seston), principalmente de fitoplancton (SHUMWAY y PARSONS, 2006). Pertenece al Phylum Mollusca, Clase Bivalvia, Familia Pectinidae. Se caracteriza por poseer valvas grandes, fuertes, pectiniformes (forma de abanico) y convexas (la superior ligeramente más que la inferior). Cada valva presenta entre 24 y 26 estrías radiales bastante uniformes y posee una coloración externa que varía del rosado al púrpura oscuro, algunas veces con coloración naranja (Guzman y Ortlieb, 1998).

Está distribuida a lo largo de la costa del Pacífico tropical, encontrándose desde Corinto, Nicaragua hasta la IV región en el norte de Chile. Los bancos más importantes se encuentran desde Paita, Perú (5°S, 81°W) hasta Valparaíso, Chile (33°S, 71°W) (Peña, 2001). *A. purpuratus* habita en zonas protegidas del submareal entre los 5 y 20 m de profundidad y temperaturas que oscilan entre los 14°C y 20°C, con niveles de oxígeno de 0,2 a 8,0 mL/L (Bermudez y Aquino, 2004), encontrándose principalmente en fondos arenosos de

escasa corriente (Avendaño y Cantillanez, 1996). Sin embargo, también se puede encontrar sobre sustratos fangosos, pedregosos o cubiertos de macroalgas. Dentro de sus principales predadores se encuentran los caracoles, pulpos, cangrejos, estrellas de mar y erizos (Mendo *et al.* 2011).

El inicio del ciclo de vida de *A. purpuratus* comienza con la fertilización, considerada como el tiempo "0" de la edad larval (Bellolio, Toledo y Campos, 1994). Su desarrollo larval presenta tres estadios planctónicos: trocófora, D-recta y pediveliger. La larva trocófora se forma luego de aproximadamente 12-24 horas post-fecundación (pf) con un tamaño de 60-80  $\mu\text{m}$ . Esta larva se convierte en una D-veliger (de charnela recta) entre 72-96 horas pf. y dura aproximadamente entre 15-22 días dependiendo de la temperatura y de la disponibilidad y calidad del alimento ingerido. La cual se transforma en una larva pediveliger desarrollando un pie que le permite adherirse al sustrato en el que se establece hasta la metamorfosis post-larval. Luego, durante el desarrollo post-larval se forma la valva característica del individuo adulto (Uriarte, Farias y Carlos, 2001) la fase juvenil inicia a los 10-15 días después del asentamiento, con una altura aproximada de 1 mm. Mientras que la

fase adulta, con aproximadamente 60 mm, se alcanza después de 180 días (Mendo *et al*, 2011) (Figura 1).



**Figura. 1.** Ciclo de vida de *A. purpuratus*

**Fuente:** Modificado de Mendo *et al.* 2011.

### 2.1.1 Aspectos Reproductivos

*A. purpuratus* es un hermafrodita funcional (maduración simultánea y liberación de gametos secuencial) con fecundación externa. La parte femenina de la gónada presenta coloración rojiza, mientras que la gónada masculina

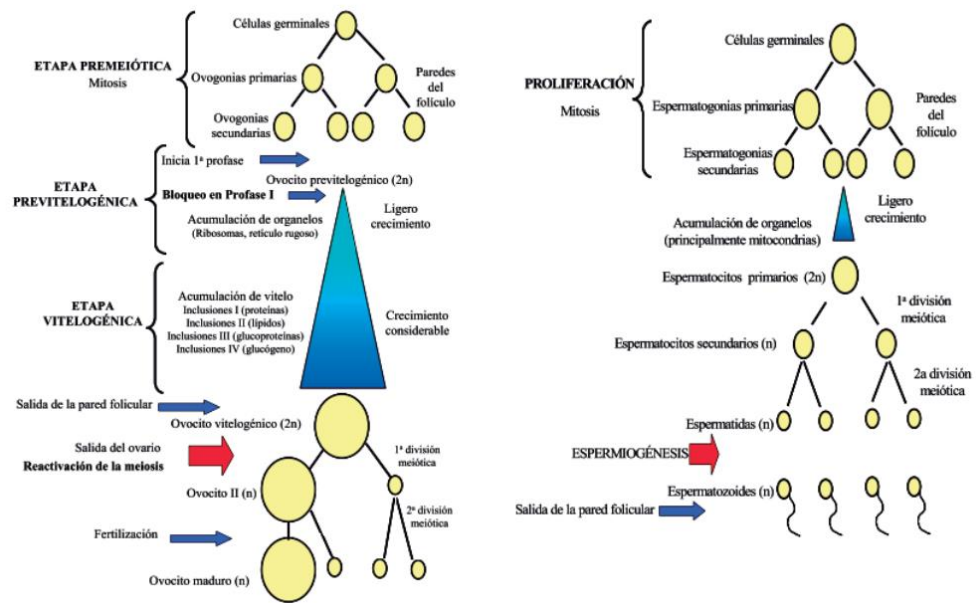
presenta coloración blanquecina (Guzman y Ortlieb, 1998). Es una especie con una maduración sexual muy temprana, la talla de primera madurez sexual es de 25 mm (Mendo, Yamashiro, Rubio y Kameya, 1989), esta especie tiene un ciclo reproductivo continuo durante todo el año (Chavez y Ishiyama, 1989), siendo difícil encontrar un estadio claro de reposo e individuos completamente desovados (Disalvo, Alarcón, Martínez y Uribe, 1984). Brown y Guerra (1980) afirman que la recuperación de las gónadas ocurre rápidamente.

Los gametos femenino y masculino maduran de forma simultánea, pero durante el periodo de desove, los espermatozoides son liberados antes que los ovocitos por el mismo conducto (Uriarte *et al.* 2001). Este proceso es conocido como protandria y previene la auto - fecundación de los moluscos bivalvos hermafroditas (Gosling, 2003).

La concha de abanico, como bivalvo marino, tiene ciclos reproductivos que incluyen los periodos de formación de gametos (gametogénesis), desove, fertilización, desarrollo

larval, desarrollo post-larval y crecimiento hacia la madurez reproductiva (Barber y Blake, 2006).

La gametogénesis es la proliferación y crecimiento de los gametos, ésta se realiza en el interior de los folículos femeninos (ovogénesis) y masculinos (espermatogénesis). La ovogénesis y la espermatogénesis en los moluscos de la familia Pectinidae se puede sintetizar en etapas muy bien diferenciadas que determinan el crecimiento de los folículos y por consiguiente de la gónada (Roman, Martinez, Garcia y Freites, 2001) (Figura 2). En la ovogénesis, el crecimiento y la maduración de los ovocitos son procesos asociados que dependen de la acumulación de reservas (proteínas, lípidos y fosfolípidos, glucoproteínas y glucógeno) y de la proliferación y participación de organelos celulares. En el caso de la espermatogénesis, el crecimiento es menor y se produce durante el paso de espermatogonias secundarias a espermatocitos primarios, como consecuencia de la acumulación de organelos celulares (Dorange y Le Penec, 1989).



**Figura 2.** Esquema general de la ovogénesis (izquierda) y la espermatogénesis (derecha) en pectínidos.

**Fuente:** Arellano, 2005

Durante todo el ciclo reproductivo, particularmente al inicio del desove y al final de la temporada de reproducción, se observa la lisis de los ovocitos. Se cree que ésta proporciona sustratos metabólicos para la producción de energía en el momento en que las reservas energéticas en el músculo aductor bajan (Beninger, Le Penne y Donval, 1991).

### **2.1.2 Explotación y cultivo de la concha de abanico**

*A. purpuratus* tiene adecuadas características para el cultivo, entre ellas posee un crecimiento rápido, alcanzando la talla comercial de aproximadamente 75-80 mm de altura de valva a los 18 meses (Stotz y Gonzalez, 1997). Otra ventaja es que es una especie nativa, que muestra una buena supervivencia en su área de distribución original y tiene un alto valor comercial (Shumway y Parsons, 2006).

Los bancos naturales de concha de abanico son áreas donde tradicionalmente existe un asentamiento natural de larvas. Los más importantes se encuentran en la Bahía Sechura, Isla Lobos de Tierra, Isla Blanca, Bahía de Samanco, Los Chimús, Las Salinas, Guaynuna, Tortugas, Bahía Independencia, Bahía de Paracas, Lagunillas, Isla San Lorenzo, Isla El Frontón, entre otros (Mendo, Wolff, Carbajal, Gonzales y Badjeck, 2008).

La pesquería de esta especie se lleva a cabo con buceo semi-autónomo en embarcaciones mayormente de madera de aproximadamente 8 metros de eslora y provistas

de una compresora que provee de aire a los buzos (Mendo *et al.* 2008).

La producción de la concha de abanico es favorecida por las condiciones bio-oceanográficas. Por ejemplo, la ocurrencia de eventos El Niño afecta de manera positiva al crecimiento, reproducción y reclutamiento de esta especie en la costa centro-sur del Perú, así también en el norte de Chile (Mendo *et al.* 1989; Mendo y Wolff, 2003; Mendo *et al.* 2008).

### **2.1.3 Abastecimiento de semilla**

Se conoce como semilla a los individuos juveniles de *A. purpuratus* con tallas menores de 25 mm de altura valvar (Mendo *et al.* 1989). En Bahía de Paracas, la semilla puede ser obtenida mediante captación natural en colectores, por producción en ecloserías (laboratorios) (Bandin y Mendo, 1999) o por la extracción de semillas directamente de los bancos naturales.

La captación natural de *A. purpuratus* consiste en ofrecer sustratos adecuados de fijación en el momento exacto en que la larva pasa de un estadio planctónico a uno

bentónico (Mendo *et al.* 2011). Los bancos naturales proveen de larvas (veliger o menores) al sistema colector.

El sistema de colectores consiste en bolsas de malla plástica (mandas de Netlon), que están suspendidas de una línea longitudinal “longline” para formar una cortina o barrera para el paso de las larvas que nadan en la columna de agua (Shunway, Burkholder y Springer, 2006). El tiempo de exposición de los colectores está relacionado con las condiciones ambientales de la zona de cultivo, la presencia de predadores y competidores del “biofouling”. Asimismo, la cosecha se realiza dos o tres meses después de la instalación de los colectores hasta que las post-larval alcancen tallas de 10 a 20 mm (Mendo *et al.* 2011).

A falta de larvas disponibles en el medio, son los laboratorios o “hatcheries” los que suministran de semilla a los maricultores. Los hatcheries trabajan con reproductores de *A. purpuratus* y los inducen al desove. La técnica más utilizada para inducir el desove es la estimulación térmica mediante el aumento de temperatura de 5 a 7° C (Bourne, Hodgson, Whyte y Station, 1989). Si la estimulación térmica no funciona,

se utilizan inductores químicos como la serotonina que es aplicada por inyección intramuscular para promover la liberación de espermatozoides (Barriles y Gaete, 1991).

De estas tres opciones la más costosa es la producción de semillas en laboratorio. La extracción de semilla en bancos naturales es la más barata, pero está restringida por ley y solo es permitida en casos excepcionales (Mendo *et al.*, 2011). Sin embargo, no existe un sistema de control y vigilancia estricto que permita la aplicación efectiva de estas normas lo cual significa un riesgo para la sostenibilidad de la producción de los bancos de concha de abanico. La captación de post-larvas usando colectores artificiales actualmente es una tecnología usada con éxito en muchos países (Mendo *et al.*, 2011).

#### **2.1.4 Etapa de engorde**

La etapa de engorde del cultivo de *A. purpuratus* comienza con la siembra de semillas en sistema suspendido (en Pearl nets o linternas) o en sistema de fondo (en corrales). El crecimiento en talla y peso, y la supervivencia de juveniles de esta especie es mayor en sistemas suspendidos que en

fondo. Sin embargo, el área potencial de cultivo y los beneficios del cultivo en fondo son mayores que del cultivo suspendido (Alcazar y Mendo, 2008).

En etapas de engorde los pescadores artesanales y empresas se agrupan en asociaciones para abastecerse de semillas (generalmente proveniente de extracción en bancos naturales), sembrarlas y engordarlas en las áreas de concesión acuícola ubicadas en zonas protegidas cercanas a la costa. El sistema de cultivo de fondo es el más utilizado y su éxito depende de las condiciones particulares del lugar como la composición y el perfil del fondo, la profundidad y las corrientes (Alcazar y Mendo, 2008). Luego de la siembra, las semillas se dispersan, crecen y engordan en función de las variables ambientales, la densidad, el sustrato de siembra y de la prelación y competencia con otros animales o algas (Mendo *et al.* 2011).

Los cambios en la producción en rendimiento de músculo aductor y gónada de *A. purpuratus* son muy dependientes a los cambios ambientales, factores abióticos del agua y bióticos. Por ellos es necesario un monitoreo

frecuente de las principales variables que afectan el medio acuático (Mendo *et al.* 2011). En general sólo algunas empresas realizan monitoreos constantes de los cambios ambientales, los cuales se pueden realizar con kits o con equipos de medición; el equipo más usado es el multiparámetro, que generalmente realiza mediciones de temperatura, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica y pH.

#### **2.1.5 Comercialización**

La cosecha de los individuos adultos se realiza de acuerdo a las tallas mínimas permisibles (65 mm de altura), al peso del músculo aductor y gónada, y a los precios del mercado al momento de la cosecha. De estos factores los que más influyen en la toma de decisión de cosechas son la condición gonadal y el precio del mercado. Los pescadores determinan de manera empírica la madurez gonadal, viendo la consistencia, el tamaño y la coloración de la gónada; una gónada llena y turgente, con coloración naranja-rojiza intensa indican el momento de cosecha (Mendo *et al.* 2011).

El precio de venta de *A. purpuratus* depende del destino (mercado interno o exportación) y la presentación. Para el

mercado interno el precio de solo músculo es mayor que músculo y gónada, ocurriendo lo contrario con los precios para exportación (Mendo *et al.* 2011).

## **2.2 Bahía de Samanco-Ancash**

En el litoral marino de la Región Ancash, las actividades de maricultura han tomado mucho auge en los últimos años. Tanto empresarios como organizaciones de pescadores solicitan concesiones marinas para orientarlas al cultivo de organismos. En este contexto, los bancos naturales de invertebrados bentónicos juegan un rol importante, no solamente como fuente de recursos para los pescadores extractores; sino también, como fuente para la captación de larvas. Instituto del Mar del Perú (IMARPE, 2009).



**Figura 3.** Región Ancash

**Fuente:** [https://es.wikipedia.org/wiki/Departamento\\_de\\_%C3%81ncash](https://es.wikipedia.org/wiki/Departamento_de_%C3%81ncash)

La bahía de Samanco es una de las más importantes de la Región Ancash, se encuentra ubicada entre los 09°10' y 09°17' LS y de 78°28' a 78°34' LW, comprendiendo un área de aproximadamente 6900 Ha. Tiene una longitud aproximada de 6 millas por 3,5 millas de ancho, una profundidad máxima de 40 metros en la entrada de la bahía (entre punta Cabezo y punta Filomena al SE de la bahía) y cuenta con unos 9 km de playa baja. (IMARPE, 2009)



**Figura 4.** Bahía Samanco

**Fuente:** Datos de mapas 2016 Google Imágenes 2016. TerraMetrics.

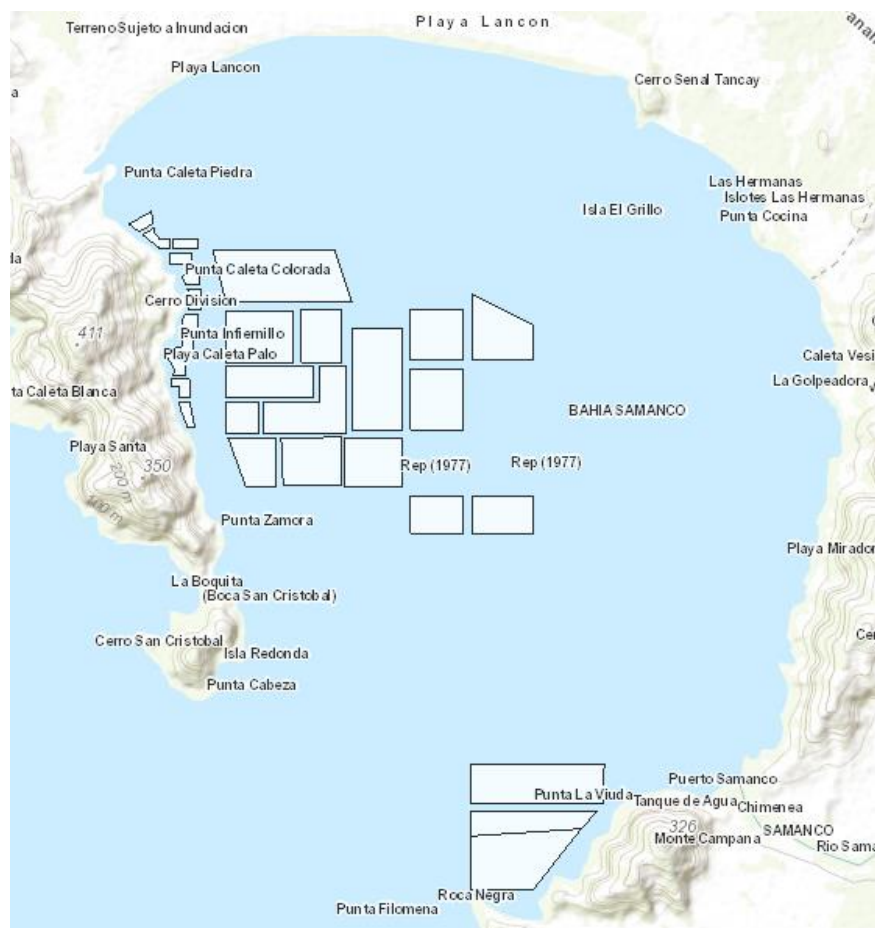
La circulación de la corriente marina es muy lenta con velocidades de 1,2 a 13,9 cm/s y generalmente en sentido horario, en el fondo la circulación se presenta cíclica en las proximidades de la línea de costa con flujos que dejan la bahía por la Bocana con dirección sur este y sur.

Geográficamente limita en su extremo norte con la bahía Ferrol, por medio de una pampa baja de arena, de forma triangular y lados curvilíneos que se extienden hacia el SW. La parte más occidental termina en una cadena perpendicular de cerros de mediana altura que da al conjunto una configuración muy peculiar en forma de T, que la hace muy fácil de identificar; está formada por un conjunto de elevaciones que remata en su extremo sur en la isla Redonda, de la cual se abre un canal de unas 2 millas de ancho hasta la punta Filomena que da paso a la espaciosa y cerrada Bahía Samanco, que tiene 6 millas de largo y 3½ millas de ancho. (IMARPE, 2009).

Actualmente en la bahía existen 25 áreas otorgadas como concesiones para realizar maricultura de mayor escala, cubriendo 1009 hectáreas de espejo de agua lo que significa aproximadamente el 15% de la superficie de la bahía. La bahía de Samanco es de suma importancia por los siguientes motivos:

- Se gran productividad marina favorece una intensa actividad pesquera artesanal (peces e invertebrados comerciales)
- Presenta gran biodiversidad.

- Presenta atractivo ecoturístico, por acantilados, islas y playas arenosas como Vesique, Atahualpa y Anconcillo.
- Constituye una gran área de reproducción, crecimiento y refugio de especies propias y ocasionales.
- Facilita el desarrollo de la maricultura.
- Facilita el desarrollo de la industria pesquera.
- Constituye un laboratorio natural de procesos de aclimatación en especies invasoras, modelamiento de procesos físicos, modelamientos de procesos ecológicos (sucesión poblacional) y como fuente de información científica-cultural para la comunidad. (IMARPE, 2009)



**Figura 5.** Áreas otorgadas como concesiones para la maricultura.

**Fuente:** <http://catastroacuicola.produce.gob.pe/web/>

La cosecha de la acuicultura peruana en el año 2010 alcanzó poco más de 89 mil toneladas, siendo que el 81% son cosechas del ámbito marino y el 19% proviene del ámbito continental. Se puede apreciar en líneas generales que todos los sistemas de producción acuícola experimentaron un crecimiento notable a partir de 2002,

particularmente los principales cultivos (Concha de abanico, langostinos y trucha arco iris), aunque la producción de tilapias y de peces amazónicos también crecieron durante este periodo, pero en una menor proporción. (Ministerio de la Producción, 2011)

En el año 2008 el cultivo de conchas de abanico sufrió una baja debido a eventos naturales como marea roja y el ingreso de corrientes cálidas que afectaron con altas mortalidades el cultivo y la producción de semillas de la especie; sin embargo, se ha recuperado notablemente y el proceso de formalización de las asociaciones de pescadores artesanales que se dedican a la actividad de repoblamiento en Piura ha permitido tener un mejor registro sobre las cosechas de acuicultura de dicha especie como se puede apreciar en las estadísticas del año 2010. (Ministerio de la Producción, 2011)

Actualmente, existen departamentos que vienen convirtiéndose en las principales zonas de producción acuícola en el país, por sus características ambientales y condiciones para el desarrollo de un buen cultivo de acuicultura y áreas apropiadas, tal es así que se ha caracterizado a Tumbes como la zona de mayor actividad acuícola para la especie de langostino; Piura y Ancash

para la concha de abanico; San Martín y Piura con la tilapia; Junín, Huancavelica, Lima, Pasco y Puno se viene caracterizando como las principales zonas para la producción de la trucha y San Martín, Loreto, Ucayali y Madre de Dios para los diversos peces amazónicos como son la gamitana, el paco, el sábalo cola roja, el paiche y el boquichico. (Ministerio de la Producción, 2011)

Se ha podido determinar que el mercado interno en el periodo 2000- 2010 aun ha tenido un crecimiento a una tasa de 22%; para el año 2010, diversas especies han incrementado su volumen comercializado como son la trucha, tilapia, gamitana, sábalo cola roja y el paiche; sin embargo, las especies concha de abanico y langostino han reducido considerablemente su comercio en el mercado interno debido en el caso de concha de abanico, ha existido una mayor demanda y mejor precio en el mercado de exportación y en el caso de langostino la reducción del comercio en el mercado interno se ha debido a que este sector está a la espera de una mayor demanda del mercado de exportación teniendo en cuenta la mejoría de precios de venta, se viene almacenando la producción a la espera de la oportunidad de mercado. (Ministerio de la Producción, 2011)

La concha de abanico, también conocida como ostión abanico y ostión del norte está referida a la especie *Argopecten purpuratus*, un molusco bivalvo presente en toda la zona costera peruana, la semilla se obtiene por captación directa del ambiente natural – denominado acuicultura basada en captura- y en una menor proporción a través de algunos laboratorios que cuentan con la tecnología para la producirlos en ambientes controlados.

El cultivo se lleva a cabo principalmente en sistemas “suspendido” o denominados “Long – line” y en menor medida en sistemas de “fondo”. Las fases de cultivo incluyen: captación de semilla, cultivo intermedio (3 a 6 meses) y engorde (6 meses, hasta que alcance 5 a 8 cm.), culminando en la cosecha. Se considera que los principales factores que contribuyen al desarrollo de este cultivo en el país, son la existencia de abundante semilla de la especie en el medio natural, clima apropiado para alcanzar tallas comerciales en corto tiempo; dominio de la técnica de maduración sexual artificialmente, alta productividad del mar peruano en el mercado internacional; sus principales desventajas consisten en la dependencia de las condiciones ambientales para la obtención de semilla y la presencia frecuente de episodios de marea roja. (Ministerio de la Producción, 2011)

### 2.3 Floraciones algales

Las Floraciones Algales Nocivas (FAN) son fenómenos producidos por la proliferación y el dominio ocasional de determinadas especies de algas tóxicas o nocivas. Los brotes de estas especies se han convertido en una grave amenaza para la acuicultura y la explotación de los recursos en los sistemas de surgencia costera y otras regiones costeras. (Crespo y Figueiras, 2007; Kudela *et al.* 2005; Trainer, Pitcher, Reguera y Smayda, 2013)

Estos impactos se extienden desde mortalidad de peces o moluscos silvestres y cultivados a enfermedades y la muerte de humanos y mamíferos marinos debido a las potentes toxinas. (Anderson, 2007; Blanco, 2001; Hallegraeff, 1993; Landsberg, 2002)

Los episodios nocivos por fitoplancton son aquellos producidos por microalgas que no producen toxinas, pero que su presencia puede generar daños a los organismos marinos o perjuicios socioeconómicos a las actividades desarrolladas por el hombre en las zonas costeras (Reguera, 2002). Entre estos episodios destacan aquellos que tienen la capacidad de producir mortalidad en organismos marinos por efectos mecánicos (Bell, 1961; Horner, Postel y Rensel, 1990; Clement, 1994), producto de su

elevada actividad fotosintética (Takano, 1956; Sakamoto, 1999; Kahru, Mitchell, Diaz y Miura, 2004; Brownlee, Sellner y Sellner, 2005), por la formación de espuma o mucílago (Cabrini, Fonda Umani y Honsell, 1992; Herndl, 1992) o por interacciones biológicas como la capacidad predatoria del dinoflagelado *Pfiesteria shumwayae* sobre larvas de pectínidos (Springer, Shumway, Burkholder y Glasgow, 2002; Shumway y Parsons, 2006).

Otro tipo de episodios nocivos, son aquellos en los que el fitoplancton contiene sustancias que son acumuladas por los bivalvos alterando su aspecto o su sabor, disminuyendo por lo tanto su valor comercial y produciendo pérdidas a los cultivadores o mariscadores (Blanco, 2001). Actualmente, no existen muchos registros que mencionen cambios en las características organolépticas de los bivalvos. Entre los casos reportados se encuentran los cambios de coloración de las glándulas digestivas de los bivalvos *Placopecten magellanicus* y *Ostrea edulis* (Kat, 1984; Carver, Mallet, Warnock y Douglas, 1996) durante floraciones del ciliado *Mesodinium rubrum* (= *Myrionecta rubra*) y la alteración del sabor de los tejidos de los bivalvos *Mytilus edulis*, *Pecten alba* y *Ostrea angasi*, que adquirieron un fuerte sabor amargo, asociada a

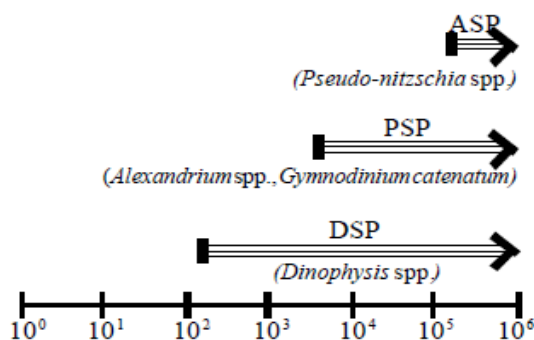
una floración de la diatomea *Rhizosolenia chunii* (Parry, Langdon y Huisman, 1989).

Además, existen especies fitoplanctónicas con la capacidad de producir toxinas. Algunas de estas especies son capaces de causar la muerte de peces por la producción de ictiotoxinas (Dahl, Lindahl, Paasche y Throndsen, 1989; Gentien y Arzul, 1990; Lush, Hallegraeff y Munday, 1998) y otras, al ser ingeridas por los moluscos, pueden causar mortandades masivas en diversas especies de bivalvos o producir intoxicaciones en humanos, mamíferos marinos y aves (Hallegraeff, 1993; Blanco, 2001; Landsberg, 2002; Anderson, 2007).

Aunque este tipo de eventos han ocurrido desde hace cientos de años (Hallegraeff, 1995; Margalef, 1998; Blanco, 2001), en las últimas décadas se ha observado un incremento aparente, no solo en el número de especies productoras, sino también en su frecuencia, intensidad y distribución geográfica, especialmente de aquellas que producen episodios tóxicos (Smayda, 1998; Hallegraeff, 1993; Hallegraeff, 2004), lo que ha motivado al desarrollo de programas de control para proteger la salud pública y

el desarrollo de las actividades de la acuicultura (Anderson, Andersen, Bricelj, Cullen y Rensel, 2001).

Algunas microalgas producen toxinas tan potentes, que pueden resultar dañinas, aunque no alcancen concentraciones celulares elevadas que descoloren el agua. Bastan unos pocos cientos (o miles, según la especie) de células por litro para que los mariscos adquieran niveles de toxinas que sobrepasan los límites legales establecidos como niveles de regulación. Definimos como *episodios de microalgas tóxicas* aquellos eventos en los que la presencia de microalgas en concentraciones moderadas (no causantes de discoloraciones) confieren niveles de toxinas a los moluscos tales que pueden constituir un peligro para la salud, y obligan a las autoridades competentes a prohibir su recolección y comercialización. (Fernandez *et al.* 2002)



**Figura 6.** Rango de concentraciones celulares de microalgas planctónicas tóxicas dentro de los cuales se manifiesta la presencia de toxinas en los bivalvos.

**Fuente:** Fernandez *et al.* 2002.

## 2.4 Toxinas marinas

El mayor problema se produce cuando los moluscos bivalvos como almejas, mejillones, ostras o vieiras de las zonas de marisqueo se alimentan de estos dinoflagelados tóxicos y van acumulando las toxinas en sus tejidos comestibles. Estas toxinas no afectan a la viabilidad del molusco, que tampoco presenta ni un aspecto ni un sabor diferente del no contaminado, además el cocinado u otros tratamientos factibles en el procesado de alimentos no suelen destruir las toxinas, por lo que es muy fácil que sean ingeridas por los consumidores sin percatarse de su presencia hasta que empiezan a manifestarse sus síntomas. Pueden aparecer en niveles

que resultan asintomáticos, pasando por niveles que causan molestias o hasta niveles letales para humanos u otros consumidores (Ciminiello y Fattorusso, 2004; Munday, 2006).

Así, los moluscos actúan como vectores de serias intoxicaciones, como la Intoxicación Paralizante por Moluscos (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP), la Intoxicación Amnésica por Moluscos (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP), la Intoxicación Diarreogénica por Moluscos (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP), la Intoxicación Neurotóxica por Moluscos (Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP), la Intoxicación Ciguatérica (Ciguatera Fish Poisoning, CFP) o la Intoxicación por Azaspirácidos (Azaspiracid Poisoning, AZP). También se les suele denominar como la toxina causante del síndrome, más que como el síndrome que causan, es decir: toxinas paralizantes (PST), amnésicas (AST), diarreicas (DST) o neurotóxicas (NST) (Leira *at al.*, 2002; Arévalo *et al.* 2006).

Cuatro grupos químicos de toxinas se incluyen en el grupo de toxinas lipofílicas: Ácido okadaico (incluyendo las dinofisistoxinas), pectenotoxinas, azaspirácidos y el grupo de las Yesotoxinas.

## 2.4.1 Toxinas lipofílicas diarreogénicas

### 2.4.1.1 Grupo del ácido okadaico

El grupo del ácido okadaico es el causante de la intoxicación diarreica por consumo de moluscos (DSP). El primero episodio de este tipo de intoxicación del que se tiene referencia se produjo en Holanda en 1961 (KAT, 1979), pero en ese momento el agente causante no fue identificado. Años después describieron un episodio similar sucedido en 1970 en Chile y encontraron una relación con la aparición de una importante proliferación de organismos pertenecientes al género *Dinophysis*. Inicialmente la comunidad científica no dio gran importancia a estos descubrimientos. Sin embargo tras la aparición de dos nuevas intoxicaciones, una en Japón en 1976, en la que resultaron afectadas 42 personas que presentaron vómitos y diarreas severas tras haber consumido mejillones (*Mytilus edulis*) y vieiras (*Patinopecten yessoensis* y *Chlamys nipponensis akazara*), y otra en 1977, en la misma zona y estación del año con síntomas similares a la anterior, en las que resultaron afectadas 122 personas, se decidió

empezar a investigar las posibles causas (Blanco, Moroño y Fernandez, 2005).

La cuantificación de este tipo de toxicidad pudo realizarse por primera vez gracias a las investigaciones de Yasumoto, Oshima y Yamaguchi (1978), consiguieron aislar por primera vez 2 tipos de toxinas lipofílicas e implementar un bioensayo en ratón para su detección.

La principal toxina responsable de estas intoxicaciones fue identificada por Murata, Shimitami, Sugitani, Oshima y Yasumoto (1982) como OA, una molécula que ya había sido aislada y descrita previamente en la esponja *Halichondra okadai* (Tachibana *et al.* 1981)

Respecto a los organismos productores de esta toxina no se supo nada hasta que en 1980. Yasumoto *et al.* relacionaron a las toxinas DSP con el dinoflagelado planctónico *Dinophysis fortii* y en 1982, Murata *et al.*, hicieron lo propio con el dinoflagelado bentónico *Prorocentrum lima*.

A raíz de estos nuevos descubrimientos se empezaron a identificar toda una serie de episodios tóxicos previos causados por las DSP en numerosas partes del mundo, como

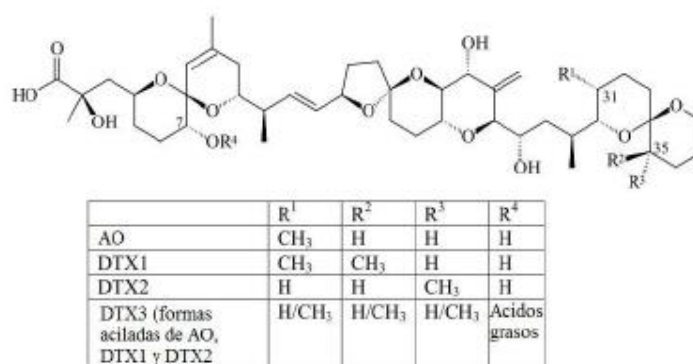
España (Campos, Fragas, Mariño y Sanchez, 1982) y Noruega (Underdal, Yndestad y Aune, 1985). No obstante, la mayoría de ellos se asociaron a la aparición de individuos de *Dinophysis* (resumen en Europa en Van Egmond, Aune, Lassus, Speijers y Waldock, 1993), y solo en rara ocasiones, a la presencia de *Prorocentrum lima* y otras especies del mismo género.

#### **2.4.1.1.1 Estructura química y análogos**

Actualmente, OA, DTX1, DTX2 y los acil-ésteres, son considerados como las toxinas más relevantes con capacidad de producir intoxicaciones diarreogénicas (Yasumoto *et al.*, 1980; Murata *et al.*, 1982; Hu, Curtis, Walter Y Wright, 1995).

Éstas pueden ser consideradas como las más importantes debido a su amplia distribución mundial (Revisado por Reguera y Pizarro, 2008) y su elevada morbilidad (Hallegraeff, 1995). El límite regulatorio establecido para este tipo de toxicidad

corresponde a 160  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de equivalentes de OA.  
European Food Safety Authority (EFSA, 2009c).



**Figura 7.** Estructura química del ácido okadaico (OA), dinofisistoxina 1 (DTX1), dinofisistoxina 2 (DTX2) y derivados acilados “DTX3”. Adaptado de European Food Safety Authority

**Fuente:** EFSA, 2008

#### 2.4.1.1.2 Mecanismo de acción

Estas toxinas, actúan sobre sus receptores farmacológicos, las fosfatasa PP1 y PP2A (Bialojan y Takai, 1988), produciendo la inflamación del tracto intestinal, diarreas y el efecto promotor de

tumores (Hamano, Kinoshita y Yasumoto, 1986; Cohen, Holmes y Tsukitani, 1990).

El Ácido Okadaico (OA) y sus análogos dinofisistoxina-1 (DTX-1) y Dinofisistoxina-2 (DTX-2) son inhibidores específicos de la serina/treonina proteína fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A respectivamente) (Bialojan y Takai, 1988; Larsen, 2007). El efecto diarreogénico del ácido okadaico y las dinofisistoxinas se atribuye a la acumulación de proteínas fosforiladas que controlan la secreción de sodio en las células intestinales y a la inhibición de la defosforilación de elementos.

Los principales síntomas de la intoxicación que producen son diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Estos trastornos gastrointestinales suelen aparecer durante las primeras cuatro horas desde la ingestión del molusco contaminado y, desaparecer al cabo de tres días (Aune y Yndstad, 1993).

#### 2.4.1.1.3 Distribución y organismos

##### productores

El grupo del ácido okadaico es producido por dinoflagelados que pertenecen al género *Dinophysis* spp. Y *Prorocentrum* spp. Bajo las condiciones ambientales favorables, estas algas pueden crecer ampliamente en número y producir floraciones algales.

La producción de estas toxinas ha sido confirmada en 7 especies de *Dinophysis*: *D. fortii* (en Japón), *D. acuminata* (en Europa), *D. acuta*, *D. norvegica* (en Escandinavia), *D. mitra*, *D. rotundata* y *D. tripos*, y en el dinoflagelado bentónico *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum* (o *P. maculosum*) y *Prorocentrum redfieldi* (Viviani, 1992).

Otras 3 especies de *Dinophysis*, *D. caudata*, *D. bastata* y *D. sacculus*, son también sospechosos (citado de Hallegraeff, Anderson y Cembella, 1995). Giacobbe *et al.* (2000) mostraron que *D. sacculus*

contenía OA y dinofisistoxina-1 (DTX1) en concentraciones de 110-400 fg/cell, respectivamente. Las máximas concentraciones de toxinas (OA+DTX1 445 fg/cell) fueron encontrados en las floraciones de principios de primavera. Los autores sugirieron que el papel de *D. sacculus* en los eventos nocivos en el área mediterránea puede estar lejos de ser insignificante a pesar de su baja toxicidad.

#### **2.4.1.2 Grupo de los Azaspirácidos**

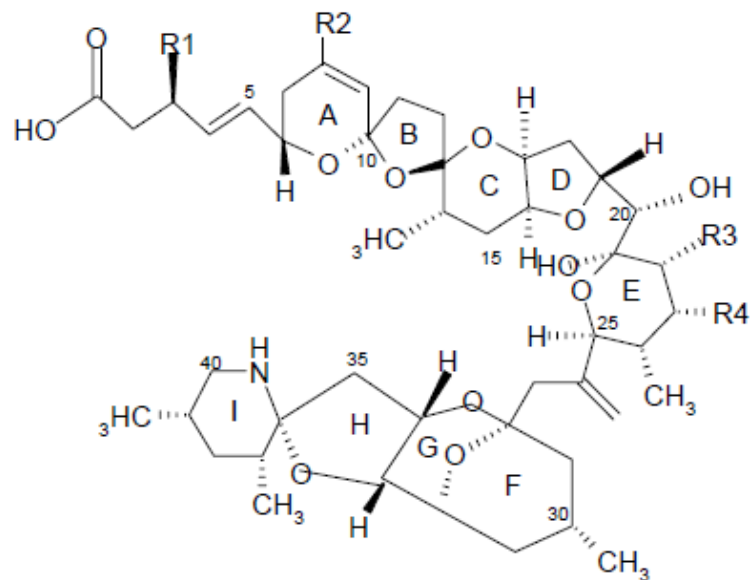
La intoxicación por azaspirácidos en moluscos (Azaspiracid Shellfish Poisoning, AZP), se descubrió en el año 1995 durante una intoxicación ocurrida en los Países Bajos, en la cual al menos 8 personas consumieron mejillones (*Mytilus edulis*) provenientes de Killary Harbour, Irlanda (McMahon y Silke, 1996). Los síntomas de las personas intoxicadas fueron similares a los causados por el OA y las DTXs. Sin embargo, los análisis registraron que los niveles de estas toxinas se encontraban por debajo del límite regulatorio (Revisado por Twiner, Rehmann, Hess y Doucette, 2008). En

los años posteriores SATAKE *et al.* (1998), descubrieron que los moluscos estaban contaminados con un compuesto tóxico el que fue preliminarmente denominado “Killary toxin” o KT-3.

#### **2.4.1.2.1 Estructura química y análogos**

Los azaspirácidos (AZAs). Son un grupo de toxinas que comprende al menos 21 análogos (Satake *et al.* 1998); Ofuji *et al.*, 1999; James, Sierra, Lehane, Magdalena y Furey, 2003; Rehmann, Hess y Quilliam, 2008). Estos compuestos, se caracterizan por tener una amina cíclica (grupo aza), un anillo de unión azaspiro y un ácido carboxílico (Satake *et al.* 1998). Entre los azaspirácidos, se ha comprobado que el AZA-1 es el más tóxico y el principal responsable de las intoxicaciones, seguido por los AZA-2 y AZA-3 (Ito *et al.*, 2000; Ito *et al.* 2006)

Actualmente, 20 diferentes análogos han sido identificados (Satake *et al.* 1998b; Ofuji *et al.*, 1999; James *et al.*, 2003, Rehmann *et al.* 2008).



	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>
azaspiracid (AZA)	H	H	CH <sub>3</sub>	H
azaspiracid-2 (AZA2)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
azaspiracid-3 (AZA3)	H	H	H	H
azaspiracid-4 (AZA4)	OH	H	H	H
azaspiracid-5 (AZA5)	H	H	H	OH

**Figura 8.** Estructura química de azaspirácidos 1-5

**Fuente:** Nicolaou *et al.* 2006 a,b.

#### 2.4.1.2.2 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de los azaspirácidos no está del todo elucidado. Inicialmente, se creía que este tendría los mismos mecanismos de acción que el ácido okadaico,

inhibiendo las fosfatasas (PP1 y PP2A). Sin embargo, estudios de inhibición de fosfatasa realizados con extractos de mejillones con azaspirácidos y con AZA-1, no produjeron la inhibición de esta enzima. Actualmente, se están desarrollando numerosas investigaciones para comprender sus mecanismos de acción (Twiner *et al.* 2008). En humanos, los síntomas de la intoxicación incluyen náuseas, vómitos, diarrea y fuertes dolores abdominales (McMahon y Silke, 1996).

Los síntomas aparecen de 3 a 18 horas después de comer mariscos contaminados y la recuperación es completa dentro de 2 a 5 días. (James, Fidalgo Saez, Furey y Lehane, 2004; McMahon y Silke, 1996)

El límite regulatorio establecido para este tipo de toxicidad corresponde a  $160 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Efsa, 2009c).

#### **2.4.1.2.3 Distribución y organismos**

##### **productores**

Desde el episodio tóxico ocurrido en Irlanda, esta toxina ha sido detectada sólo en el hemisferio norte, en países europeos como Dinamarca, España, Francia, Inglaterra, Noruega y Portugal (Twiner *et al.* 2008). Además, ha sido detectada en Marruecos (Taleb *et al.* 2006) y Canadá (Twiner *et al.* 2008). Inicialmente la producción de este tipo de toxina fue atribuida al dinoflagelado heterótrofo *Protoperidinium crassipes* (James *et al.* 2003a), pero recientemente Krock, Tillmann, Jhon y Cembella (2009b) determinaron que este dinoflagelado sólo era un vector de la toxina que era producida por un pequeño dinoflagelado recientemente descrito como *Azadinium spinosum* (Tillmann, Elbrachter, Krock, Jhon y Cembella, 2009).

## 2.4.2 Toxinas lipofílicas no diarreogénicas

### 2.4.2.1 Grupo de las Yesotoxinas

Inicialmente, las Yesotoxinas se clasificaron dentro del grupo de las toxinas diarreicas (DSP), debido a su coexistencia y coextracción con ácido okadaico y dinofisistoxinas en moluscos contaminados (Fonfría, 2009).

La yesotoxina (YTX) se aisló por primera vez en Mutsu Bay, Japón, en 1986 (Murata, Kumagai, Lee y Yasumoto, 1987) de las glándulas digestivas de la vieira *Patinopecten yessoensis*, de la que ha adquirido su nombre. Posteriormente se encontró en el mejillón *Mytilus edulis* (Blue mussel) en Noruega (Lee, Tangen, Dahl, Hovgaard y Yasumoto, 1988), en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* del Mar Adriático en Italia (Ciminiello *et al.* 1997), en los mejillones *Perna canaliculus* (Greenshell mussel) de Nueva Zelanda y *Mytilus chilensis* de Chile (Yasumoto y Takizawa, 1997), así como en *Mytilus galloprovincialis* de las Rías Gallegas (Arevalo *et al.* 2006).

El dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* (Claparède et Lachmann) Butschli 1885, fue el primer organismo

identificado como productor de YTX, y se hizo 11 años más tarde del descubrimiento de la YTX, en un cultivo unialgal de *P. reticulatum* de nueva Zelanda (Satake, Mackenzie y Yasumoto, 1997a). Posteriormente, la YTX se encontró en células de *P. reticulatum* de diferentes cepas aisladas en YAMADA BAY (Satake, Ichimura, Sekiguchi, Yoshimatsu y Oshima, 1999) y Mutsu Bay (Eiki *et al.* 2005) en Japón, en el Mar Adriático en Italia (Ciminiello *et al.* 2003b), en Escocia, en Canadá (Stobo *et al.* 2003) y en Noruega (Samdal *et al.* 2004b) y en varias cepas de *P. reticulatum* aisladas en España (Paz, Riobo, Fernandez, Fraga y Franco, 2004; Paz, Riobo, Ramilo y Franco, 2007).

El dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge 1989, también se ha apuntado como organismo productor de YTX, ya que se encontraron homoYTX y 45-hidroxi-homoYTX en *Mytilus galloprovincialis* del Mar Adriático durante un bloom en el que *L. polyedrum* representaba el 99% de los dinoflagelados (Satake, Tubaro, Lee y Yasumoto, 1997b), así como YTX en arrastre de red de varios blooms naturales en los que *L. polyedrum* era el dinoflagelado

mayoritario (Tubaro, Sidari, Della Loggia y Yasumoto, 1998; Draisci *et al.* 1999).

Aunque *L. polyedrum* parece estar bastante relacionado con la producción de YTXs, esto no se pudo probar en cultivos unialgales de *L. polyedrum* (Boni *et al.* 2000).

#### **2.4.2.1.1 Estructura química y análogos**

Inicialmente se determinó por resonancia magnético nuclear (RMN) que la YTX tenía una estructura planar con la fórmula molecular  $C_{55}H_{82}O_{21}S_2Na_2$  (Murata *et al.* 1987) pero, la configuración absoluta es más reciente (Satake, Terasawa, Kadowaki y Yasumoto, 1996; Takahashi, Kusumi, Kan, Satake y Yasumoto, 1996). Es un poliéter disulfatado, de elevado peso molecular 1141 [M-H]<sup>-</sup>, que posee un esqueleto de 47 carbonos en forma de escalera, formada por 11 anillos éter contiguos, una cadena lateral terminal insaturada de 9 carbonos y 2 ésteres de sulfato (Murata *et al.* 1987).

La estructura básica es de naturaleza liposoluble y los grupos sulfato le proporcionan propiedades hidrosolubles que, en conjunto, dan lugar a una sustancia anfótera, por lo que se puede extraer adecuadamente con metanol: agua (Yasumoto y Takizawa, 1997). La presencia del grupo sulfo-ester hace a estas moléculas de las más polares en el grupo de toxinas lipofílicas, debido a ello, resulta fácil encontrar cantidades importantes de YTX en el medio de cultivo (Paz *et al.* 2004).

Además de la YTX se han descrito numerosos análogos incluyendo sus estructuras y configuraciones, cuyo peso molecular varía entre 955 y 1551 (Satake *et al.*, 1996; Miles *et al.*, 2005a; Miles *et al.* 2006). Hasta el momento se han identificado y caracterizado por resonancia magnética nuclear y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) 36 derivados naturales, si bien teóricamente se han descrito unos 90 cuya estructura se desconoce

(Miles *et al.* 2005). Se cree que todavía existen más análogos debido a que la concentración de YTX determinada por ELISA es mayor que la determinada por LC-MS. Esta diferencia se debe a que con el ELISA se detectan todos los análogos de la YTX conjuntamente (conocidos y desconocidos), pero con el método de LC-MS se identifican individualmente, por lo que los análogos desconocidos posiblemente no se detecten ni cuantifiquen por LC-MS (Samdal, Aasen, Briggs, Dahl y Miles, 2005). Algunos de ellos son producidos directamente por los dinoflagelados y otros son producto del metabolismo de los moluscos.

El primer análogo de la YTX en moluscos fue la 45-hidroxiYTX en *P. yessoensis* (Yasumoto, Murata, Lee y Torigoe, 1989), más tarde en la misma especie, se identificó la 45, 46, 47-trinorYTX (Satake *et al.* 1996). Posteriormente se encontraron en mejillones del Mar Adriático (*Mytilus galloprovincialis*) otros análogos como: la

homoYTX, la 45-hidroxihomoYTX (Satake *et al.* 1997b), la adriatoxina (Ciminiello *et al.* 1998), la carboxiYTX (Ciminiello, Fattorusso, Forino, Poletti y Viviani, 2000), la carboxihomoYTX (Ciminiello, Fattorusso, Forino, Poletti y Viviani, 2000), la noroxohomoYTX (Ciminiello, Fattorusso, Forino y Poletti, 2001) (=42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxohomoYTX ó 41-ketohomoYTX) y la noroxoYTX (Ciminiello *et al.* 2002a) (=42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxoYTX ó 41-ketoYTX) y, en mejillón Noruego, la 1-disulfoYTX (DAIGUJI *et al.*, 1998b) . Más recientemente, se identificaron en *Mytilus edulis* de Noruega la 41a-homoYTX, la 45,55-dihidroxiYTX (Mackenzie *et al.*, 2002; Finch *et al.* 2005) y la 45-hidroxicarboxiYTX (Aasen *et al.*, 2005). Los últimos análogos identificados en moluscos son dos desulfoYTXs detectadas en mejillones del Mar Adriático: la 1-desulfocarboxihomoYTX y la 4-desulfocarboxihomoYTX (Ciminiello *et al.* 2007).

A pesar de este elevado número de análogos hallados en los moluscos como producto de su metabolismo, el mayoritario suele ser la 45-hidroxiYTX, seguido por la carboxiYTX.

La primera referencia sobre el metabolismo de las YTXs en el molusco indica que probablemente la YTX y la homoYTX sean oxidadas a 45-OHYTX y 45-OHhomoYTX respectivamente (Yasumoto y Takizawa, 1997).

Estudios más recientes señalan que, tras la ingestión del alga, el molusco oxida rápidamente la YTX a 45-OHYTX y un poco más lentamente a carboxiYTX, a su vez posiblemente la 45-OHYTX se metabolizaría a 45-OHcarboxiYTX aún más lentamente (Aasen *et al.* 2005).

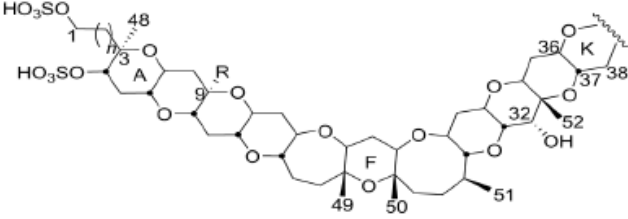
Esta hipótesis se apoya en que mayoría de las YTXs encontradas en el molusco son 45-OHYTX y carboxiYTX, que van apareciendo a medida que la concentración de YTX disminuye

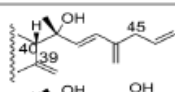
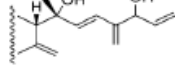
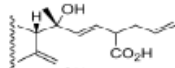
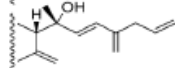
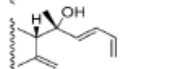
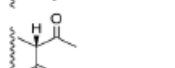
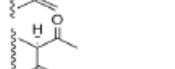
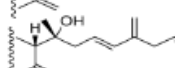
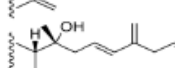
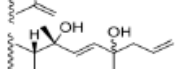
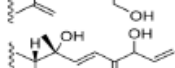
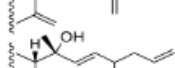
(Mackenzie, Suzuki y Adamson, 2001; Samdal *et al.* 2005)

La YTX puede transformarse a 45-OHYTX tanto por *Perna canaliculus* como por *Mytilus galloprovincialis*, pero con una mayor eficiencia en el segundo caso, que convierte más del 90% de la YTX en 45-OHYTX y *P. canaliculus* transforma menos del 10% (Mackenzie, Suzuki y Adamson, 2001)

Hay cierta controversia sobre si algunos de los análogos son producidos exclusivamente por el molusco o también por el alga. Según Ciminiello *et al.* (2003) un pequeño porcentaje de la 45-OHYTX, 45-OHhomoYTX, carboxiYTX y carboxihomoYTX son producidas directamente por el alga, pero se sabe que la mayor parte de la 45-OHYTX, carboxiYTX y sus formas homo se deben al metabolismo de la YTX y homoYTX en el molusco (SAMDAL *et al.*, 2005), además, en los últimos estudios, ni la 45-OHYTX ni la carboxiYTX se

encontraron en el dinoflagelado (Samdal *et al.*, 2004b; Miles *et al.*, 2005a; Paz *et al.* 2007).



	R	n	m/z
<b>1</b> YTX		1	1141
<b>2</b> 45-hydroxyYTX		1	1157
<b>3</b> carboxyYTX		1	1173
<b>4</b> 1a-homoYTX		2	1155
<b>5</b> 45,46,47-trinorYTX		1	1101
<b>6</b> ketoYTX		1	1047
<b>7</b> 40-epi-ketoYTX		1	1047
<b>8</b> 41a-homoYTX		1	1155
<b>9</b> 9-Me-41a-homoYTX		1	1169
<b>10</b> 44,55-dihydroxyYTX		1	1175
<b>11</b> 45-hydroxy-1a-homoYTX		2	1171
<b>12</b> carboxy-1a-homoYTX		2	1187

n=number of methyl groups in the molecule m/z=mass to charge ratio (molecular mass of the analogue diminished by 1 dalton ([M-H]<sup>-</sup> ions))

**Figura 9.** Estructura química de una selección de toxinas del grupo de las Yesotoxinas (YTXs).

**Fuente:** Ligeramente modificado por Hess y Aasen 2007.

#### **2.4.2.1.2 Mecanismo de acción**

Aunque se han desarrollado muchos trabajos de citotoxicidad intentando elucidar este tema actualmente se desconoce el mecanismo de acción preciso de la YTX, lo que sí parece claro es que no inhibe la actividad de las protein-fosfatasa (PP1 y PP2A) (Ogino, Kumagai y Yasumoto, 1997), cuando otras toxinas lipofílicas si lo hacen.

Debido a su similitud con las brevetoxinas y ciguatoxinas podría actuar como agente despolarizante, abriendo los canales de membrana de células permeables al sodio e implicando una entrada de  $\text{Na}^+$ , sin embargo la YTX no actúa sobre los canales de  $\text{Na}^+$  (Ciminiello *et al.* 1999).

Según estudios con linfocitos humanos parece que la YTX produce dos efectos diferentes en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ : por un lado induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de los canales de sensibles a la nifedipina y al SKF 96365 (bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ), por

modulación de la adenosina monofosfato cíclica (AMPc) haciendo que aumenten los niveles  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos y, por otro lado, inhibe la entrada capacitiva de  $\text{Ca}^{2+}$  (entrada activada por el vaciamiento de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ ), que es activada bien por la taspigargina (inhibidor de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico) o por la pre-incubación en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (De La Rosa, Alfonso, Vilariño, Vieytes y Botana, 2001). También es posible que los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenten por liberación de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  o por inhibición de los mecanismos de salida (De La Rosa *et al.* 2001). Estudios posteriores indican que las YTX producen apoptosis en distintos tipos celulares como el neuroblastoma humano (Alfonso, De La Rosa, Vieytes, Yasumoto y Botana, 2003) por una inducción de distintas isoformas de las caspasas (mediadores en los procesos de apoptosis) (Leira *et al.* 2002b)

Otros estudios sugieren como mecanismo de acción la activación de las fosfodiesterasas (PDEs) que disminuyen los niveles intracelulares de AMPc dependiendo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular (Alfonso *et al.* 2003). Si el blanco fuera las PDE III, que son abundantes en el músculo cardíaco, se explicaría fácilmente la cardiotoxicidad, pero esto requiere estudios adicionales (Blanco *et al.* 2005)

Recientemente, Bianchi *et al.* (2004) señala que la YTX en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la permeabilidad de la membrana de la mitocondria del hígado de rata (Bianchi *et al.* 2004), y Ferrari *et al.* (2004) sugiere una relación entre la estructura y la actividad de las YTXs en cultivos celulares, en la que la cadena C<sub>9</sub> terminal es fundamental (Ferrari *et al.* 2004)

La toxicidad de las Yesotoxinas por inyección intraperitoneal es alta y una concentración de aproximadamente 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  es

letal para todos los ratones. (Fernandez et al. 2002). Los síntomas comienzan dentro de las cuatro horas de la inyección y se caracterizan por síntomas de agotamiento, por lo que los ratones mueren rápidamente por disnea súbita. Estudios de microscopía electrónica reveló que la toxina produce daños en el músculo cardiaco (Terao, Ito, Yanagi y Yasumoto, 1996; Suarez, Hetland, Espenes, Tranulis y Anue, 2006) así como el hígado y el páncreas (aune, Sorby, Yasumoto, Ramstad y Landsverk, 2002; Ogino *et al.* 1997), y más recientemente, se informó de que la yesotoxina (YTX) también produce daño neuronal en el cerebro (Franchini, Marchesini, Poletti y Ottaviani, 2004). Por lo tanto, las yesotoxinas (YTXs) deben ser consideradas como potencialmente tóxicas para los seres humanos, con una dosis letal (LD 50) que varía entre los diferentes análogos de entre 80 y 750 µg/kg.

### 2.4.2.1.3 Distribución de organismos

#### productores

Las Yesotoxinas se demostraron originalmente como un metabolito aislado de *Protoceratium reticulatum* (antes *Gonyaulax grindleyi*) de Nueva Zelanda por Satake, Mackenzie y Yasumoto (1997b).

La producción de YTX ha sido desde entonces demostrada en *P. reticulatum* aislados de Japón (Satake *et al.* 1999); Italia (Ciminiello *et al.* 2003); Noruega (Samdal, Naustvoll, Olseng, Briggs y Miles, 2004); España y Estados Unidos de América (Paz *et al.* 2004); Chile y Canadá Oriental. Los niveles típicos reportados son de 3-12 picogramos/cell. Además de YTX, *P. reticulatum* ha demostrado producir trinoryesotoxina (Satake *et al.* 1999). heptanor-41-oxoyesotoxina, 1a-homoyesotoxina, a carboxiyesotoxina y a hidroxiyesotoxina (Ciminiello *et al.* 2003).

La 1a- homoyesotoxina fue identificada en una floración algal en la cual *Lingulodinium polyedrum* fue el alga predominante (Draisci *et al*, 1999b), y evidenció que este organismo puede producir yesotoxina fue proporcionada por la identificación de YTX en cultivos aislados en España. (Paz *et al*, 2004). Recientemente, YTX, pero no homoYTX, fue encontrada en las aguas costeras de Nueva Zelanda y mariscos contaminados por una floración algal estrechamente relacionada al dinoflagelado *Gonyaulax cf spinifera* (Rhodes, Mcnabb, Beuzenberg y Briggs, 2004).

*Protoceratium reticulatum*, *Lyngulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera* son dinoflagelados productores de YTXs (Lesley *et al*. 2006). *Protoceratium reticulatum* usualmente produce YTX y homoYTX (Paz *et al*. 2008).

#### **2.4.2.2 Grupo de las Pectenotoxinas**

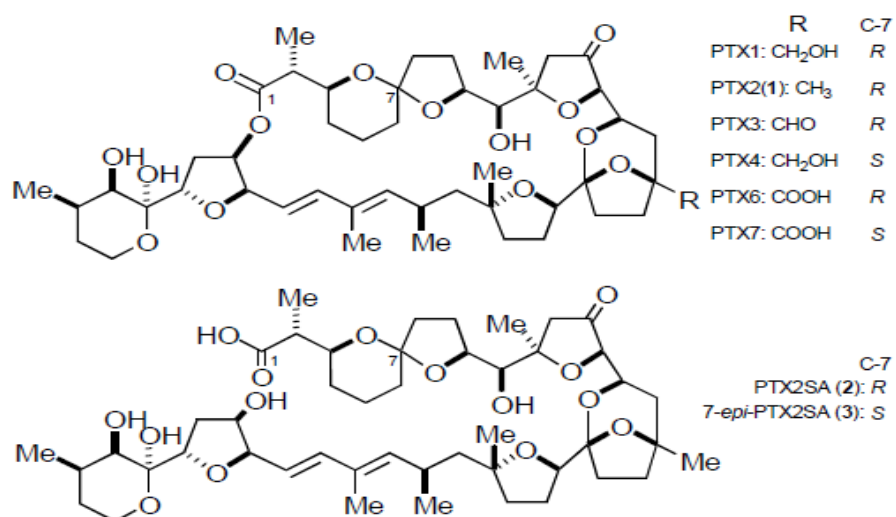
La presencia de pectenotoxinas (PTXs) en moluscos fue descubierta debido a su alta toxicidad aguda por bioensayo en ratón (MBA) después de la inyección intraperitoneal de extractos lipofílicos. Las pectenotoxinas han sido detectadas en microalgas y moluscos bivalvos en Australia, Italia, Japón, Nueva Zelanda, Noruega, Portugal y España. Estudios en animales indican que ellas son mucho menos potentes por la ruta oral y que no inducen diarrea. No hay datos indicando efectos adversos en humanos asociados a pectenotoxinas en moluscos. Las pectenotoxinas surgen exclusivamente de especies de *Dinophysis* spp. y están siempre acompañadas por toxinas del grupo del Ácido okadaico (OA). Por lo tanto, los métodos analíticos deberán confiablemente distinguir estas toxinas, porque estas deben ser reguladas separadamente. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO. 2011).

#### 2.4.2.2.1 Estructura química y análogos

Las pectenotoxinas (PTXs) son poliésteres microcíclicos lipofílicos. La primera muestras de estas fueron aisladas de la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* a partir de la cual se deriva el nombre de pectenotoxina.

Algunas pectenotoxinas son producidas por biosíntesis en dinoflagelados del género *Dinophysis*. Entre estas toxinas se encuentran: PTX2, PTX-11, PTX-12, PTX-13 y PTX-14 (Suzuki, Beuzenberg, Mackenzie y Quilliam, 2003; MILES *et al.*, 2004b; MILES *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos son producidos por transformaciones metabólicas en los moluscos (Yasumoto y Murata, 1993; Blanco *et al.*, 2005; European Food Safety Authority (EFSA, 2009b)). De este modo, compuestos como PTX1, PTX3 y PTX6 serían producidos por la oxidación de PTX2. Además, la hidrólisis enzimática de PTX2 da origen a la PTX2 seco ácido (PTX2sa) y su epímero 7-epi-

PTX2 seco ácido (7-epi-PTX2sa) (Yasumoto, Igarachi y Satake, 2001), siendo estos últimos metabolizados para formar ésteres con ácidos grasos de distinta longitud (WILKINS *et al.*, 2006). Por otra parte, PTX4 y PTX7 son epímeros de PTX1 y PTX6, respectivamente y PTX9 y PTX8 (no encontradas en moluscos) son formadas como artefactos en condiciones ácidas por el par de epímeros mencionados anteriormente (Sasaki, Satake y Yasumoto, 1997).



**Figura 10.** Estructura de las principales pectenotoxinas (PTXs) y ácidos secoicos de las pectenotoxinas (PTXSA).

**Fuente:** Yasumoto *et al.* 2001.

#### **2.4.2.2.2 Mecanismo de acción**

Estas toxinas, generalmente fueron incluidas entre las toxinas diarreogénicas, debido a que frecuentemente están asociadas a la presencia de ácido okadaico (MILES *et al.* 2004a). Sin embargo, en la actualidad se considera que estas toxinas no deben estar clasificadas en este grupo, debido a que existen evidencias de que estas no tienen la capacidad de producir diarreas. Con relación a sus efectos tóxicos, las PTXs presentan una ligera toxicidad al ser administradas oralmente en ratones (MILES *et al.* 2004a), no inhiben las fosfatasas, pero tiene un fuerte efecto hepatotóxico (Terao, Ito, Oarada, Murata y Yasumoto, 1990), siendo las más tóxicas por vía intraperitoneal en ratones de laboratorio las PTX2 y PTX11 (Miles *et al.*, 2004).

Hay solamente 2 reportes implicando a las pectenotoxinas en intoxicaciones de humanos o animales por consumo de moluscos. Un incidente en Australia, en 1997, involucró la hospitalización

de 56 personas en Nueva Gales del Sur después del consumo de pipis. Los síntomas incluyeron náuseas, vómitos y diarrea, y en los crustáceos considerados responsables fueron encontrados pectenotoxina-2 seco-ácido (PTX-2 SA) y bajos niveles de pectenotoxina-2 (PTX-2). En otro incidente, una mujer anciana se enfermó después de consumir “pipis cocidos” (*Donax delatoides*) en Queensland, Australia. Nuevamente, el molusco contenía altas concentraciones de pectenotoxina-2 seco-acido (PTX-2 SA) (Burgess y Shaw, 2001)

#### **2.4.2.2.3 Distribución y organismos productores**

Estas toxinas, al igual que el OA tiene una amplia distribución geográfica (Revisado por Reguera y Pizarro. 2008) y desde su descubrimiento en Japón por Lee *et al.* (1989) en *Dinophysis fortii*, han sido detectadas en diferentes especies del género *Dinophysis* como *D. acuta* (Suzuki, Mitsuya, Matsubara y Yamasaki, 1998;

James *et al*, 1999; Pavela-Vrancic *et al*, 2002; Mackenzie *et al*, 2002; Fernandez *et al*, 2003a; Suzuki *et al*, 2003; Fernandez Puente *et al*, 2004; MILES *et al*, 2004a), *D. acuminata* (MACKENZIE *et al*, 2002; MILES *et al*, 2004a), *D. norvergica*, *D. rotundata* (MILES *et al*, 2004a) y *D. caudata* (Fernandez *et al*, 2003a; Fernandez, Reguera, Gonzales y Miguez, 2006).

Algunas pectenotoxinas son producidas por biosíntesis en dinoflagelados del género *Dinophysis*. Entre estas toxinas se encuentran: PTX2, PTX-11, PTX-12, PTX-13 y PTX14. (SUZUKI *et al*, 2003; MILES *et al*, 2004b; MILES *et al*, 2006). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos son producidos por transformaciones metabólicas en los moluscos (Yasumoto y Murata, 1993; Blanco *et al*, 2005; European Food Safety Authority (EFSA, 2009b)). De este modo, compuestos como PTX1, PTX3 y PTX6 serían producidos por la oxidación de PTX2. Además, la hidrólisis enzimática de PTX2 da origen a la PTX2 seco ácido PTX2sa) y su epímero

7-epi-PTX2 seco ácido (7-epi-PTX2sa) (Yasumoto *et al.* 2001), siendo estos últimos metabolizados para formar ésteres con ácidos grasos de distintas longitudes (Wilkins *et al.* 2006). Por otra parte, PTX4 y PTX7 son epímeros de PTX1 y PTX6, respectivamente y PTX9 y PTX8 (no encontradas en moluscos) son formadas como artefactos en condiciones ácidas por el par de epímeros mencionados anteriormente (Sasaki *et al.* 1997).

## **2.5 Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas**

### **2.5.1 Cromatografía líquida**

La cromatografía líquida es una antigua técnica instrumental que ha evolucionado enormemente en los últimos años, principalmente a partir de la década de los setenta, con lo que, inicialmente concebida como método de separación, ha llegado a convertirse en una fuente inagotable de métodos de análisis. Pocos métodos de análisis químico son tan específicos para un analito en particular, ya que tanto las fases previas de extracción como

los procedimientos cromatográficos son llevados a cabo en función del tipo de molécula. (Hernandez, 2005)

El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla, para ellos, una muestra de la mezcla (o el extracto de una muestra) será disuelta en una fase móvil (en este caso un líquido). La fase móvil es impulsada a través de una fase inmóvil, que debe ser inmisible a ella, a la que se conoce como fase estacionaria, y que puede ser sólida o líquida (cromatografía líquido-sólido o cromatografía líquido-líquido para lo cual el líquido puede estar embebido o unido a partículas sólidas). Las fases son escogidas de tal forma que los componentes de las muestras presenten diferencias en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad etc.) para cada fase. Las interacciones químicas entre la fase móvil y la muestra, y entre la muestra y la fase estacionaria, determinan el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en la muestra. Un componente que interactúe más con la fase estacionaria realizará un “viaje” más largo a través de ella que otro componente que tenga más interacción con la fase móvil.

Como resultado de estas diferencias en la movilidad de los componentes de una muestra estos se separarán uno de otro. (Hernandez, 2005)

En cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil, donde es soluble, y es transportada a través de una columna por el flujo continuo de la fase móvil a alta presión. La fase estacionaria está formada por partículas de pequeño diámetro, por tanto, con una gran superficie de interacción, contenidas en la columna. Este proceso cinético es conocido con el nombre de elución. La velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna, con respecto a los demás presentes en la mezcla, está determinada por el tiempo que permanece en la fase móvil. (Hernandez, 2005)

La HPLC se puede utilizar como técnica preparativa y como técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado. La elección de la fase estacionaria y la fase móvil, del flujo al que se va a impulsar la fase móvil a través de la fase

estacionaria e incluso de la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía, permitirán una correcta separación del analito de otros compuestos. (Hernandez, 2005)

Cada componente de una solución tiene unas características determinadas bajo ciertas condiciones cromatográficas, y debe conseguirse que la migración del componente y de los contaminantes a través de la columna sea lo suficientemente distinta para que dicho compuesto sea separado de los demás del extracto, para permitir su posterior identificación y cuantificación. A este proceso se le denomina purificación. (Hernandez, 2005)

La identificación de compuestos es la parte más importante de muchos trabajos en HPLC. Para identificar compuestos se debe seleccionar un sistema de detección que mida diferentes propiedades fisicoquímicas de la molécula. Entra en juego el tipo de separación y la naturaleza de la detección, sea absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, etc. (Hernandez, 2005)

En cromatografía líquida, la fase móvil eluye de la columna durante un tiempo determinado conteniendo

cantidades muy diferentes de solutos que pasan a través de un sistema de detección. El instrumento detecta la presencia del soluto que es convertida en una señal eléctrica y ésta puede ser tratada por un procesador de datos. Se representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución, y al gráfico obtenido se le conoce como cromatograma. Los solutos se representan gráficamente como una serie de picos que pueden identificarse por su anchura, altura o área. Para la cuantificación de compuestos se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada de analito. (Hernandez, 2005).

Es preciso confeccionar previamente una curva de calibración para establecer el factor de respuesta como la pendiente de la medida del detector frente a las concentraciones de los calibradores. Para ello se realiza la inyección de una serie de soluciones del compuesto con concentraciones conocidas para su detección. Los cromatogramas obtenidos muestran una serie de picos cuyas áreas se correlacionan con la concentración del compuesto inyectado (Hernandez, 2005).

## 2.5.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructural) como cuantitativa (masa molecular o concentración) de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa, y se somete en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta alcanzar diferentes partes del detector de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación  $m/z$  (Cocho de Juan, 2007).

Así pues, para el análisis de las muestras por MS se producen 3 procesos básicamente:

- Ionización de la muestra

- Análisis de la muestra ionizada
- Detección de los compuestos formados

La ionización de la muestra es clave y puede llevarse a cabo de diferentes formas, según la naturaleza de la propia muestra y lo que se pretenda detectar en el análisis. Puede efectuarse en condiciones de alto vacío, por impacto electrónico (EI), o a presión atmosférica (API). En el último caso, si se trata de un análisis en fase líquida, se realizará una ionización por electrospray (ESI), mientras que, si es en fase gaseosa, se efectuará una ionización (APCI) o bien una fotoionización (APPI) (Cocho de Juan, 2007).

Mediante un alto voltaje, se ioniza el gas nebulizante (aire o nitrógeno) formando los primeros iones, estos primeros iones reaccionan inmediatamente con las moléculas de disolvente formando iones reactivos. Los iones reactivos reaccionan (por transferencia de un protón) con las moléculas del analito formando  $(M+H)^+$  en modo positivo o  $(M-H)^-$  en modo negativo (Cocho de Juan, 2007).

Cuando los iones atraviesan un campo magnético o eléctrico, su movimiento depende de su relación  $m/z$ , lo que constituye el principio de separación de iones en MS. El analizador de masas cuadrupolar, que es el más empleado en los laboratorios clínicos. Un cuadrupolo es un filtro de masas que consta de 4 cilindros metálicos paralelos y equidistantes. Cada par de cilindros opuestos está conectado eléctricamente. Al par de cilindros colocados en diagonal se le aplica un voltaje de corriente continua (DC) de igual magnitud, pero signo contrario, superpuesto con un voltaje de corriente alterna de radiofrecuencia (RF). Como resultado, se obtiene un campo eléctrico que origina el movimiento de los iones en la dirección  $z$  (que va desde la fuente al detector) pero con una trayectoria oscilatoria simultánea en el plano  $x-y$ . la amplitud de la oscilación sólo depende de la relación  $m/z$  y puede ser controlada modificando los voltajes de DC y RF en una proporción prefijada (Cocho de Juan, 2007).

Así, el movimiento de los iones dependerá de los campos eléctricos de modo que sólo los de una determinada relación  $m/z$  estarán en resonancia y por tanto pasarán a

través del detector. Los valores  $m/z$  que no estén en resonancia con dicha trayectoria chocarán con los cuadrupolos y no se detectarán. El rango de masas y la resolución del instrumento quedan determinados por la longitud y el diámetro de los cilindros (Cocho de Juan, 2007).

En los laboratorios actuales, los espectrómetros de masas cuadrupolares generalmente están acoplados a cromatografía de gases o cromatografía líquida para componer un sistema de cribado con alto rendimiento. Pero los cuadrupolos también pueden configurarse en tándem para realizar estudios de fragmentación. El más habitual es el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QQQ), fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (Cocho de Juan, 2007).

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en línea recta. En el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona el ión analito de interés (habitualmente denominado ion precursor) por su masa y se le pone en contacto con un gas de colisión, generalmente Argón, en un segundo cuadrupolo (Q2),

sometido únicamente a RF, que se usa como celda de colisión para producir la fragmentación del ión precursor (Cocho de Juan, 2007).

Este proceso recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID). Los iones “hijos” resultantes de la CID están relacionados con la estructura molecular del ión precursor y se escanean en el tercer cuadrupolo (Q3) que será el que proporciona la información estructural de los iones moleculares (Cocho de Juan, 2007).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

Para la detección y cuantificación de las toxinas lipofílicas se utilizaron 40 muestras de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) procedentes de la bahía de Samanco-Ancash que fueron recolectadas entre los meses de enero y octubre del año 2015 por el programa Nacional de Sanidad de Mariscos (codificación de la zona como 01-C-SAM) al cual Certificaciones del Perú S.A. (CERPER) pertenecía como laboratorio de apoyo. Estas muestras fueron analizadas por bioensayo en ratón dando positivo para la presencia de biotoxinas marinas, dichas muestras fueron desconchadas y almacenadas a -20°C para el presente trabajo.

#### 3.2 Metodología

Para el análisis de las muestras se utilizó el “Procedimiento operativo estándar armonizado de la UE para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS. Versión 5. Para lo cual se utilizaron reactivos grado LC-MS.

### **3.2.1 Preparación de la muestra**

Se realizó el descongelado de las muestras previamente congeladas, una vez descongeladas se realizó el homogenizado de un aproximado de 100-150 gramos de tejido en una licuadora de uso casero.

### **3.2.2 Procedimiento de extracción**

Se realizó el pesado de 2,00 gramos +/- 0,05 gramos del tejido homogenizado en un tubo de centrifuga de 50 mililitros. Se Añadió 9,0 ml de metanol al 100% y se realizó un homogenizado mediante vortex durante 3 minutos al nivel máximo de velocidad. Se centrifugaron las muestras a 4500 rpm durante 10 minutos. Una vez terminado, el sobrenadante fue transferido a un matraz aforado de 20 ml. Se realizó una segunda extracción del sedimento del tejido residual con otros 9,0 ml de metanol al 100% en ultraturrax por 1 minuto. Se llevó a centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos, se transfirió y combinó el sobrenadante con el primer extracto y se enrazó a 20ml.

### **3.2.3 Análisis de toxinas libres de los grupos OA, PTX, AZA y YTX.**

Para la determinación de toxinas libres de los grupos OA, PTX, AZA y YTX se realizó el filtrado de una alícuota del extracto metanólico a través de un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  y se vializó para su análisis.

### **3.2.4 Hidrólisis**

Para detectar y cuantificar el contenido total de toxinas OA y DTXs se requirió una hidrólisis alcalina antes del análisis.

En un vial se agregó 125  $\mu\text{l}$  de NaOH 2,5 M a 1,0 ml del extracto metanólico, se homogenizó en vortex por 0,5 minutos y se llevó a baño maría a 76  $^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos. Una vez terminado se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó con 125  $\mu\text{l}$  de HCL 2,5 M y se homogenizó en vortex durante 0,5 minutos. El extracto se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  y se vializó para su análisis.

### 3.2.5 Curva de calibración

Siguiendo la metodología, para la cuantificación de los analitos Petenotoxina-1, 45-hidroxiyesotoxina y 45-Hidroxihomoyesotoxina se utilizó la curva de sus compuestos análogos.

La curva de calibración fue hecha con 6 puntos, las concentraciones fueron las siguientes.

**Tabla 1**

*Curva de calibración*

Estándar de calibración	Concentración individual grupo YTX (ng/ml)	Concentración individual grupo OA, PTX, AZA (ng/ml)
Std 1	7,5	3
Std 2	15	6
Std 3	25	10
Std 4	50	20
Std 5	75	30
Std 6	100	40

### **3.2.6 Condiciones cromatográficas**

Para el análisis de biotoxinas se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18 Columna, 130 A, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm. Con un guarda columna ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Pre-column, 130 A, 1,7, 2,1 mm x 5 mm.

Las Fases móvil fueron:

Fase móvil A: Agua ultra pura con 6,7mM de hidróxido de amonio.

Fase móvil B: Acetonitrilo/ agua ultra pura (90/10) con 6,7mM de hidróxido de amonio.

La temperatura del horno de columna fue de 40°C. y el método se desarrolló en condiciones de gradiente.

**Tabla 2***Condiciones cromatográficas*

Tiempo (min)	Flujo	Fase móvil A%	Fase móvil B%
Inicial	0,400	70,0	30,0
1,00	0,400	70,0	30,0
4,00	0,400	5,0	95,0
5,00	0,400	5,0	95,0
5,10	0,400	70,0	3,0
6,00	0,400	70,0	30,0

**3.2.7 Detección por espectrometría de masas**

Antes del análisis de la muestra, los parámetros del equipo WATERS XEVO TQ-XS fueron optimizados para alcanzar el máximo de sensibilidad, para lo cual, se utilizaron los estándares comercialmente disponibles de las diferentes toxinas marinas. Las toxinas fueron las siguientes:

- Estándar de Azaspirácido 3 (AZA3) Marca CIFGA Bach: 14-001
- Estándar de Azaspirácido 2 (AZA2) Marca CIFGA Bach: 14-001
- Estándar de Azaspirácido 1 (AZA1) Marca CIFGA Bach: 14-001
- Estándar de Yesotoxina (YTX) Marca CIFGA Bach: 15-001
- Estándar de Homoyesotoxina (HYTX) Marca CIFGA Bach: 15-001
- Estándar de Pectenotoxina 2 (PTX2) Marca NRC-CNRC Lote: 20120516
- Estándar de Ácido Okadaico (OA) Marca CIFGA Bach: 15-004
- Estándar de Dinofisistoxina 2 (DTX2) Marca CIFGA Bach: 12-001
- Estándar de Dinofisistoxina 1 (DTX1) Marca CIFGA Bach: 15-001

**Tabla 3***Iones precursores e hijos de las toxinas lipofílicas.*

Toxina	Masa Ión Precursor	Masa Ión Cuantificador	Masa Ión Confirmatorio
OA	803,362	255,100	113,050
DTX2	803,362	255,100	113,050
DTX1	817,425	255,100	113,050
YTX	570,326	467,167	396,126
45-OHYTX	578,40	396,40	467,40
HomoYTX	577,326	474,219	403,176
45-OHHomoYTX	585,40	403,400	474,400
AZA3	828,447	810,600	792,500
AZA2	856,447	838,600	820,600
AZA1	842,383	824,600	806,500
PTX 2	876,383	823,375	213,098
PTX1	892,500	821,500	213,300

**Tabla 4**

*Parámetros de optimización en modo Positivo.*

---

Parámetros en modo positivo	
Voltaje del capilar (kV)	3,5
Voltaje de cono (V)	20
Temperatura de disolvatación (°C)	600
Flujo de gas de disolvatación (L/Hr)	1000
Flujo de gas del cono (L/Hr)	150
Flujo del Gas nebulizador (Bar)	7,0

---

**Tabla 5**

*Parámetros de optimización en modo Negativo.*

Parámetros en modo Negativo	
Voltaje del capilar (kV)	3,0
Voltaje de cono (V)	20
Temperatura de disolvatación (°C)	600
Flujo de gas de disolvatación (L/Hr)	1000
Flujo de gas del cono (L/Hr)	150
Flujo del Gas nebulizador (Bar)	7,0

### **3.2.8 Cuantificación**

El valor resultante expresado en el equipo será aplicado a la siguiente fórmula para determinar la concentración de cada una de las toxinas presentes en las muestras.

$$\text{Concentration } (\mu\text{g toxin/kg}) = \left( \frac{y - b}{a} \right) \times \frac{\frac{V_F(\text{ml})}{V_H(\text{ml})} \times V_T(\text{ml})}{W(\text{g})} \times D$$

Donde:

Y = Área del pico cromatográfico.

b = Intercepto de la regresión lineal.

a = Pendiente de la curva de calibración

V<sub>T</sub> = Volumen total del extracto crudo (20 mL)

V<sub>H</sub> = Volumen del extracto usado para el análisis por  
hidrólisis.

V<sub>F</sub> = Volumen final después del hidrolizado (limpieza/  
concentración)

W = Peso del tejido de la muestra (2 g)

D = Factor de dilución (si el extracto ha sido diluido)

### 3.2.9 Expresión de los resultados

Los resultados para el grupo de toxinas se expresaron acorde a la legislación europea, como  $\mu\text{g}$  equivalente/Kg o mg equivalente/Kg, para lo cual se realizará el uso del factor equivalente de toxicidad (TEFs).

**Tabla 6**

*TEFs adoptados por EFSA para toxinas lipofílicas reguladas.*

<b>Grupo de toxinas</b>	<b>Análogo</b>	<b>TEF</b>	<b>Expresión de resultados</b>
Grupo OA	OA	1	$\mu\text{g}$ OA equivalente/Kg
	DTX1	1	
	DTX2	0,6	
Grupo PTX	PTX2	1	$\mu\text{g}$ PTX equivalente/Kg
	PTX1	1	

	AZA1	1	μg AZA equivalente/Kg
Grupo AZA	AZA2	1,8	
	AZA3	1,4	
	YTX	1	μg YTX equivalente/Kg
	HomoYTX	1	
Grupo YTX	45 OH YTX	1	
	45 OH homo YTX	0,5	

**Fuente.** EU-Harmonised-SOP-LIPO-LC-MS/MS\_V.5

#### IV. RESULTADOS

Las muestras fueron codificadas con la fecha de recolección para así agruparlas por meses y proceder al pesado de la porción a analizar, para los resultados se mostró individualmente los valores de las toxinas encontrados en las muestras para luego aplicar los factores de toxicidad equivalente y así poder expresar la cantidad de toxinas por grupo encontradas.

**Tabla 7**

*Codificación y peso de las muestras analizadas.*

<b>Código de las muestras</b>	<b>Pesos en gramos.</b>
2015-01-24	2,004
2015-01-30	2,0002
2015-02-06	2,0018
2015-02-13	2,0034
2015-02-20	2,0048
2015-02-27	2,0007
2015-03-05	2,0039
2015-03-13	2,0013
2015-03-20	2,0037

<b>2015-03-28</b>	2,0032
<b>2015-03-31</b>	2,0042
<b>2015-04-10</b>	2,0087
<b>2015-04-17</b>	2,0076
<b>2015-04-23</b>	2,0077
<b>2015-04-29</b>	2,0060
<b>2015-05-08</b>	2,0093
<b>2015-05-15</b>	2,0089
<b>2015-05-21</b>	2,0086
<b>2015-05-28</b>	2,0078
<b>2015-06-05</b>	2,0094
<b>2015-06-11</b>	2,0077
<b>2015-06-18</b>	2,0082
<b>2015-06-25</b>	2,0076
<b>2015-07-03</b>	2,0087
<b>2015-07-09</b>	2,0022
<b>2015-07-16</b>	2,0072
<b>2015-07-24</b>	2,0085
<b>2015-07-30</b>	2,0083
<b>2015-08-07</b>	2,0061
<b>2015-08-14</b>	2,0084
<b>2015-08-21</b>	2,0045

<b>2015-08-27</b>	2,0020
<b>2015-09-03</b>	2,0034
<b>2015-09-11</b>	2,0038
<b>2015-09-17</b>	2,0044
<b>2015-09-25</b>	2,0078
<b>2015-10-05</b>	2,0042
<b>2015-10-09</b>	2,0015
<b>2015-10-16</b>	2,0044
<b>2015-10-22</b>	2,0047

---

**Tabla 8**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Enero 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxina	Código de muestras	
	2015-01-24	2015-01-30
OA (µg/kg)	< 1,088	< 1,088
DTX2 (µg/kg)	< 0,601	< 0,601
DTX1 (µg/kg)	< 0,438	< 0,438
DTX3 (µg/kg)	0	0
YTX (µg/kg)	351,30	364,96
HYTX (µg/kg)	111,48	117,29
45OHYTX (µg/kg)	< 5,1	< 5,1
45OHhomoYTX (µg/kg)	< 3,5	< 3,5
AZA3 (µg/kg)	< 0,532	< 0,532
AZA1 (µg/kg)	< 0,390	< 0,390
AZA2 (µg/kg)	< 0,486	< 0,486
PTX2 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517
PTX1 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517

**Tabla 9**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Febrero 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxina	Código de muestras			
	2015-02-06	2015-02-13	2015-02-20	2015-02-27
OA (µg/kg)	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
DTX2 (µg/kg)	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
DTX1 (µg/kg)	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
DTX3 (µg/kg)	0	0	0	0
YTX (µg/kg)	351,68	403,31	657,42	726,75
HYTX (µg/kg)	114,20	132,37	204,51	230,22
45OHYTX (µg/kg)	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
45OHhomoYTX (µg/kg)	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
AZA3 (µg/kg)	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
AZA1 (µg/kg)	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
AZA2 (µg/kg)	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
PTX2 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
PTX1 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 10**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Marzo 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

<b>Código de muestras</b>					
<b>Toxinas</b>	<b>2015-03-05</b>	<b>2015-03-13</b>	<b>2015-03-20</b>	<b>2015-03-28</b>	<b>2015-03-31</b>
<b>OA (µg/kg)</b>	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
<b>DTX2 (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>DTX1 (µg/kg)</b>	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
<b>DTX3 (µg/kg)</b>	0	0	0	0	0
<b>YTX (µg/kg)</b>	858,33	370,76	743,62	1007,39	964,97
<b>HYTX (µg/kg)</b>	281,75	129,92	252,53	450,98	389,18
<b>45OHYTX (µg/kg)</b>	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
<b>45OHhomoYTX (µg/kg)</b>	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
<b>AZA3 (µg/kg)</b>	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
<b>AZA1 (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>AZA2 (µg/kg)</b>	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
<b>PTX2 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
<b>PTX1 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 11**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Abril 2015, Bahía*

*Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-04-10	2015-04-17	2015-04-23	2015-04-29
OA (µg/kg)	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
DTX2 (µg/kg)	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
DTX1 (µg/kg)	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
DTX3 (µg/kg)	0	0	0	0
YTX (µg/kg)	625,28	1160,59	1581,91	690,93
HYTX (µg/kg)	281,08	622,63	602,68	254,24
45OHYTX (µg/kg)	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
45OHhomoYTX (µg/kg)	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
AZA3 (µg/kg)	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
AZA1 (µg/kg)	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
AZA2 (µg/kg)	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
PTX2 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
PTX1 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 12**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Mayo 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-05-08	2015-05-15	2015-05-21	2015-05-28
OA (µg/kg)	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
DTX2 (µg/kg)	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
DTX1 (µg/kg)	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
DTX3 (µg/kg)	0	0	0	0
YTX (µg/kg)	1149,65	1469,46	1828,14	2006,18
HYTX (µg/kg)	401,13	542,59	666,14	815,82
45OHYTX (µg/kg)	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
45OHhomoYTX (µg/kg)	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
AZA3 (µg/kg)	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
AZA1 (µg/kg)	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
AZA2 (µg/kg)	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
PTX2 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
PTX1 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 13***Resultado del análisis de las muestras del mes de Junio 2015, Bahía**Samanco-Ancash.*

<b>Código de muestras</b>				
<b>Toxinas</b>	<b>2015-06-05</b>	<b>2015-06-11</b>	<b>2015-06-18</b>	<b>2015-06-25</b>
<b>OA (µg/kg)</b>	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
<b>DTX2 (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>DTX1 (µg/kg)</b>	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
<b>DTX3 (µg/kg)</b>	0	0	0	0
<b>YTX (µg/kg)</b>	2006,57	2050,11	1200,08	1007,17
<b>HYTX (µg/kg)</b>	772,37	750,11	397,37	372,58
<b>45OHYTX (µg/kg)</b>	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
<b>45OHhomoYTX (µg/kg)</b>	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
<b>AZA3 (µg/kg)</b>	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
<b>AZA1 (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>AZA2 (µg/kg)</b>	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
<b>PTX2 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
<b>PTX1 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 14***Resultado del análisis de las muestras del mes de Julio 2015, Bahía**Samanco-Ancash.*

<b>Código de muestras</b>					
<b>Toxinas</b>	<b>2015-07-03</b>	<b>2015-07-09</b>	<b>2015-07-16</b>	<b>2015-07-24</b>	<b>2015-07-30</b>
<b>OA (µg/kg)</b>	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
<b>DTX2 (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>DTX1 (µg/kg)</b>	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
<b>DTX3 (µg/kg)</b>	0	0	0	0	0
<b>YTX (µg/kg)</b>	1479,56	1167,72	1673,97	1340,30	1118,36
<b>HYTX (µg/kg)</b>	514,76	379,58	598,84	491,91	422,25
<b>45OHYTX (µg/kg)</b>	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
<b>45OHhomoYTX (µg/kg)</b>	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
<b>AZA3 (µg/kg)</b>	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
<b>AZA1 (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>AZA2 (µg/kg)</b>	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
<b>PTX2 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
<b>PTX1 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 15**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Agosto 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

<b>Código de muestras</b>				
<b>Toxinas</b>	<b>2015-08-07</b>	<b>2015-08-14</b>	<b>2015-08-21</b>	<b>2015-08-27</b>
<b>OA (µg/kg)</b>	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
<b>DTX2 (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>DTX1 (µg/kg)</b>	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
<b>DTX3 (µg/kg)</b>	0	0	0	0
<b>YTX (µg/kg)</b>	1008,92	1000,80	826,14	619,38
<b>HYTX (µg/kg)</b>	316,04	331,61	270,39	193,81
<b>45OHYTX (µg/kg)</b>	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
<b>45OHhomoYTX (µg/kg)</b>	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
<b>AZA3 (µg/kg)</b>	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
<b>AZA1 (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>AZA2 (µg/kg)</b>	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
<b>PTX2 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
<b>PTX1 (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 16**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Setiembre 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-09-03	2015-09-11	2015-09-17	2015-09-25
OA (µg/kg)	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
DTX2 (µg/kg)	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
DTX1 (µg/kg)	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
DTX3 (µg/kg)	0	0	0	0
YTX (µg/kg)	432,27	440,16	922,97	522,96
HYTX (µg/kg)	147,75	138,74	273,40	164,36
45OHYTX (µg/kg)	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
45OHhomoYTX (µg/kg)	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
AZA3 (µg/kg)	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
AZA1 (µg/kg)	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
AZA2 (µg/kg)	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
PTX2 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
PTX1 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 17**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Octubre 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

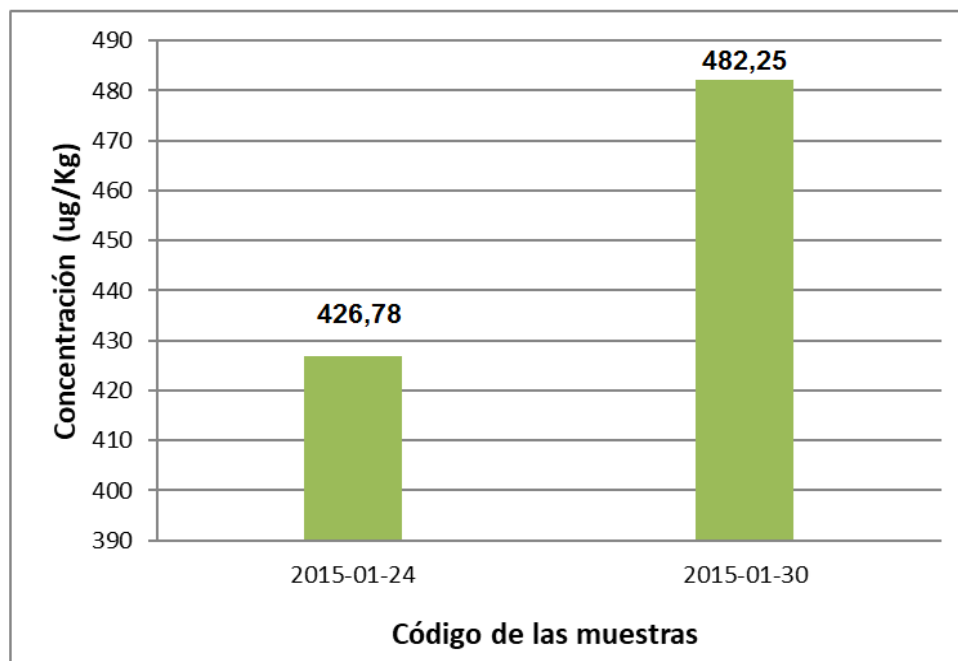
Toxinas	Código de muestras			
	2015-10-05	2015-10-09	2015-10-16	2015-10-22
OA (µg/kg)	< 1,088	< 1,088	< 1,088	< 1,088
DTX2 (µg/kg)	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
DTX1 (µg/kg)	< 0,438	< 0,438	< 0,438	< 0,438
DTX3 (µg/kg)	0	0	0	0
YTX (µg/kg)	233,51	277,79	389,14	635,51
HYTX (µg/kg)	67,86	88,93	128,71	228,46
45OHYTX (µg/kg)	< 5,1	< 5,1	< 5,1	< 5,1
45OHhomoYTX (µg/kg)	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
AZA3 (µg/kg)	< 0,532	< 0,532	< 0,532	< 0,532
AZA1 (µg/kg)	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
AZA2 (µg/kg)	< 0,486	< 0,486	< 0,486	< 0,486
PTX2 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517
PTX1 (µg/kg)	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517

**Tabla 18**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Enero 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxina	Código de muestras	
	2015-01-24	2015-01-30
Grupo OA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	< 0,601	< 0,601
Grupo YTX ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	426,78	482,25
Grupo AZA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	< 0,390	< 0,390
Grupo PTX ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	< 2,517	< 2,517

Fuente: Elaboración propia del autor.



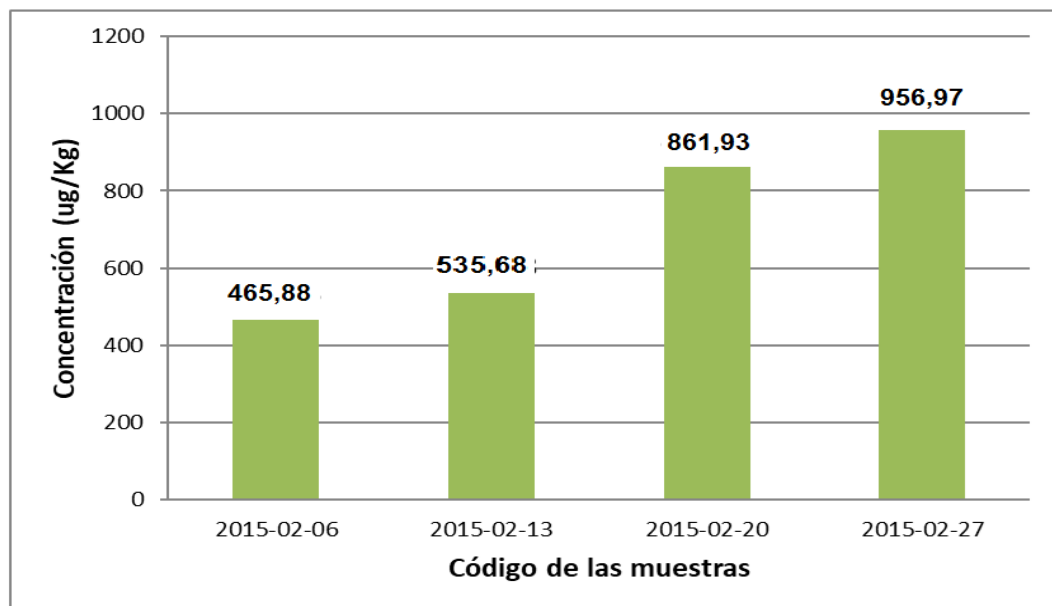
**Figura 11.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Enero

Fuente: Tabla 18

**Tabla 19**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Febrero 2015, Bahía Samanco-  
Ancash.*

Toxina	Código de muestras			
	2015-02-06	2015-02-13	2015-02-20	2015-02-27
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	465,88	535,68	861,93	956,97
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



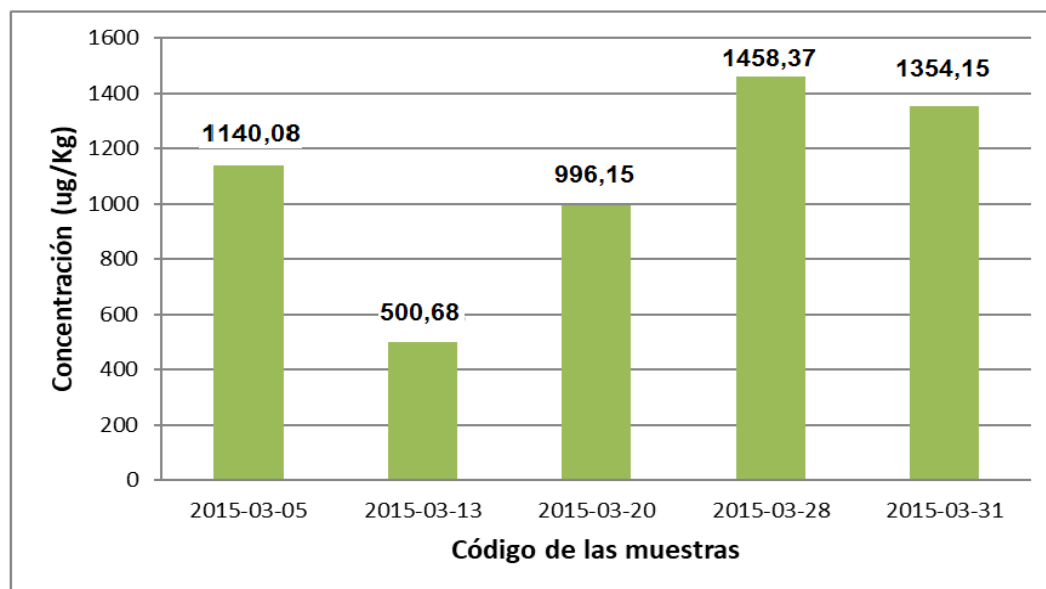
**Figura 12.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Febrero

Fuente: Tabla 19

**Tabla 20**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Marzo 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras				
	2015-03-05	2015-03-13	2015-03-20	2015-03-28	2015-03-31
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	1140,08	500,68	996,15	1458,37	1354,15
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



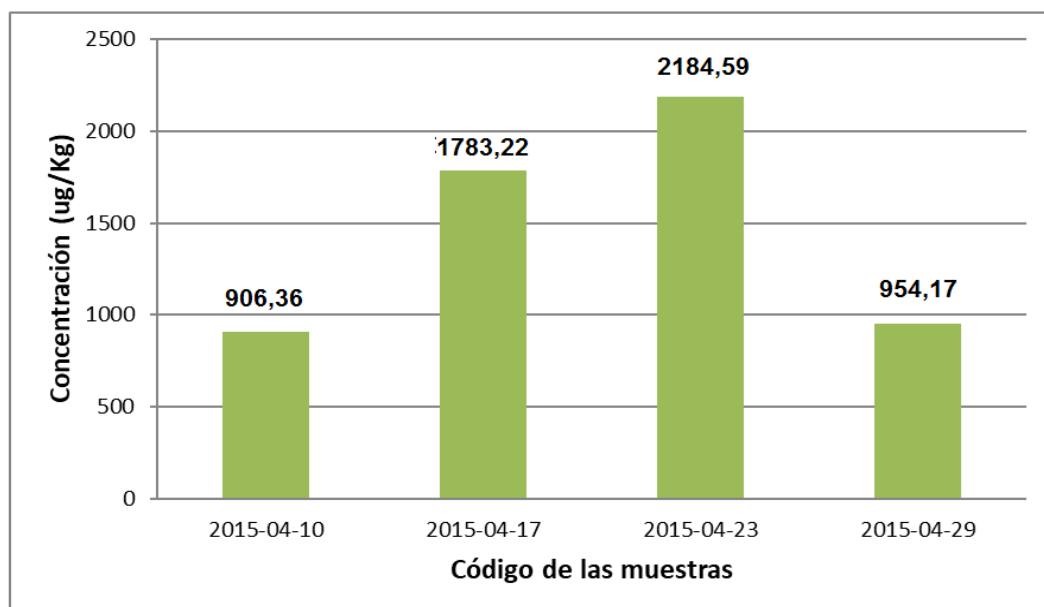
**Figura 13.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Marzo.

Fuente: Tabla 20

**Tabla 21**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Abril 2015, Bahía Samanco-  
Ancash.*

<b>Código de muestras</b>				
<b>Toxinas</b>	<b>2015-04-10</b>	<b>2015-04-17</b>	<b>2015-04-23</b>	<b>2015-04-29</b>
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	906,36	1783,22	2184,59	954,17
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



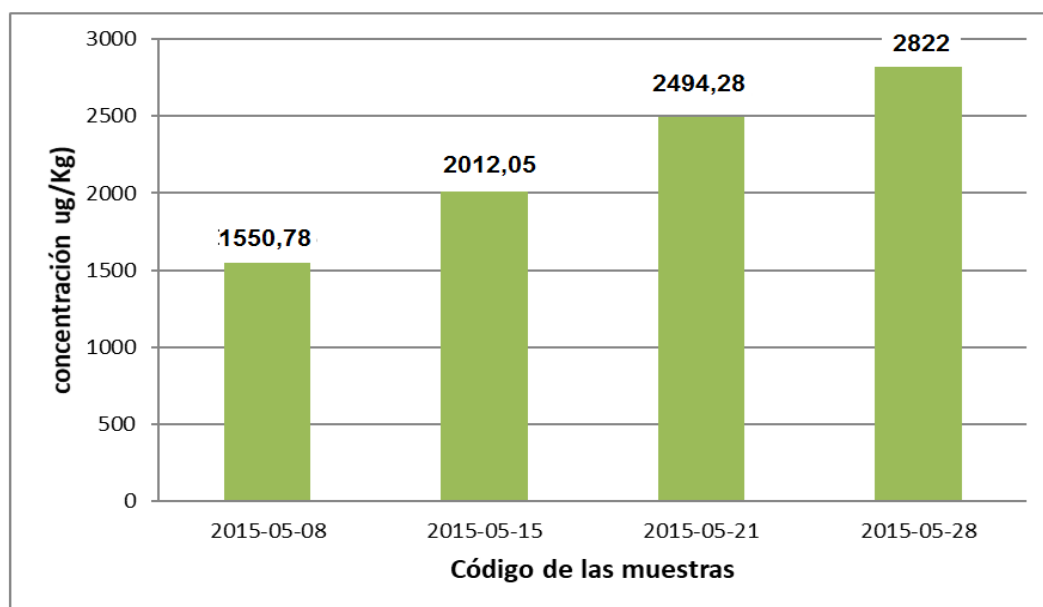
**Figura 14.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Abril.

Fuente: Tabla 21

**Tabla 22**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Mayo 2015, Bahía Samanco-  
Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-05-08	2015-05-15	2015-05-21	2015-05-28
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	1550,78	2012,05	2494,28	2822,00
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



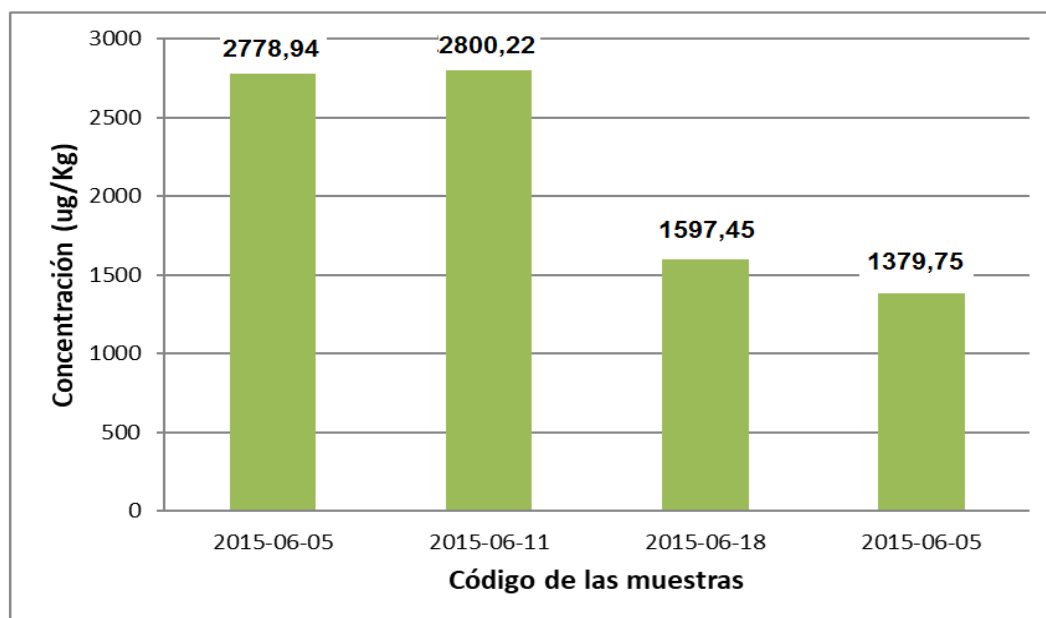
**Figura 15.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Mayo.

Fuente: Tabla 22

**Tabla 23**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Junio 2015, Bahía Samanco-  
Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-06-05	2015-06-11	2015-06-18	2015-06-25
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	2778,94	2800,22	1597,45	1379,75
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



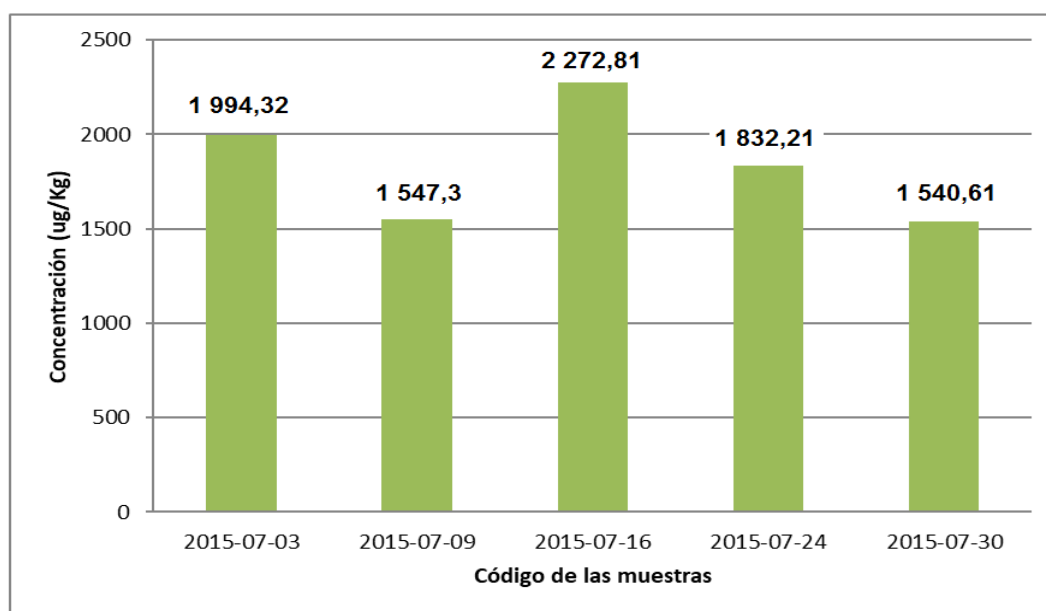
**Figura 16.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Junio.

Fuente: Tabla 23

**Tabla 24**

*Resultado del análisis de las muestras del mes de Julio 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras				
	2015-07-03	2015-07-09	2015-07-16	2015-07-24	2015-07-30
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	1994,32	1547,30	2272,81	1832,21	1540,61
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



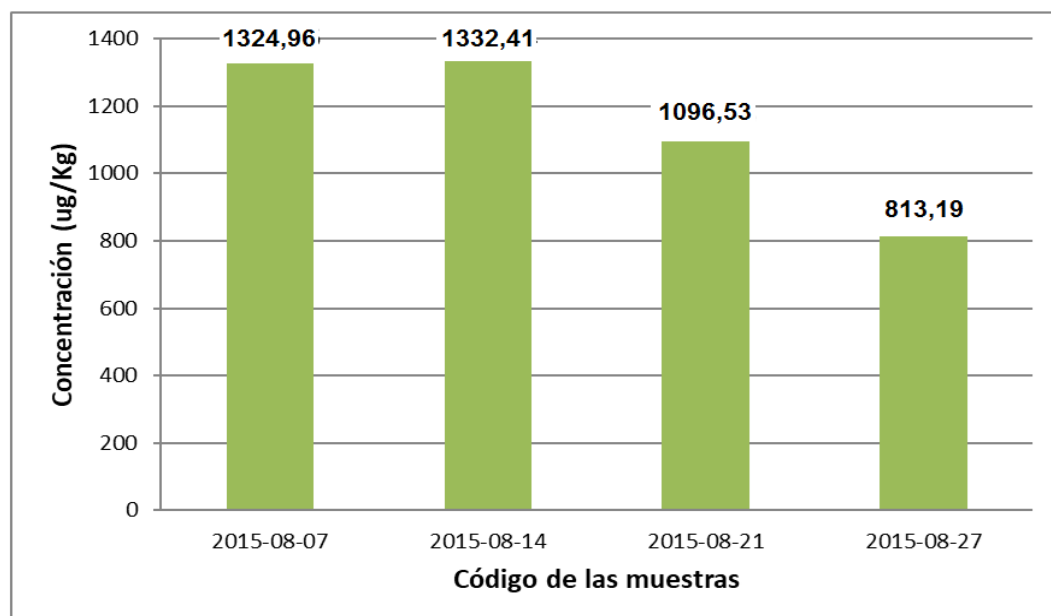
**Figura 17.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Julio.

Fuente: Tabla 24

**Tabla 25**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Agosto 2015, Bahía Samanco-  
Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-08-07	2015-08-14	2015-08-21	2015-08-27
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	1324,96	1332,41	1096,53	813,19
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



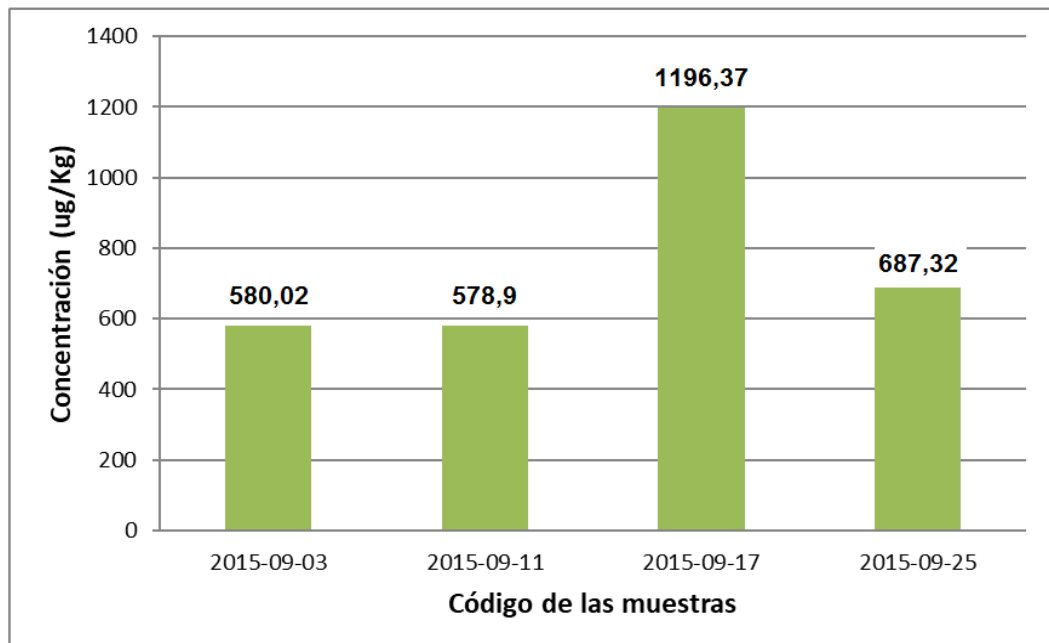
**Figura 18.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Agosto.

**Fuente:** Tabla 25

**Tabla 26**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Setiembre 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-09-03	2015-09-11	2015-09-17	2015-09-25
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	580,02	578,9	1196,37	687,32
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



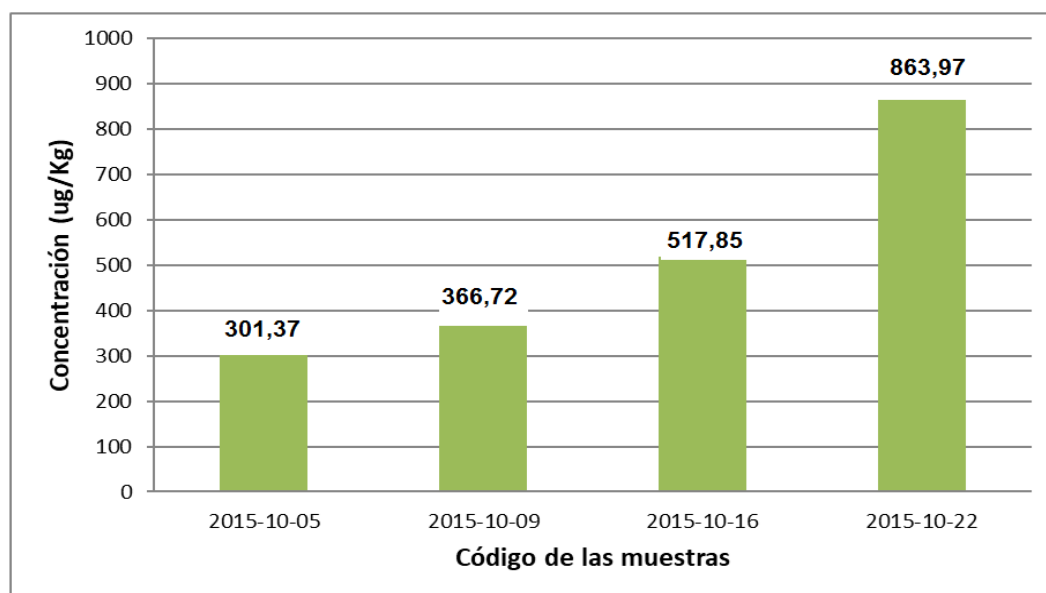
**Figura 19.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Setiembre.

**Fuente:** Tabla 26

**Table 27**

*Cantidad de toxinas por grupo mes de Octubre 2015, Bahía Samanco-Ancash.*

Toxinas	Código de muestras			
	2015-10-05	2015-10-09	2015-10-16	2015-10-22
<b>Grupo OA (µg/kg)</b>	< 0,601	< 0,601	< 0,601	< 0,601
<b>Grupo YTX (µg/kg)</b>	301,37	366,72	517,85	863,97
<b>Grupo AZA (µg/kg)</b>	< 0,390	< 0,390	< 0,390	< 0,390
<b>Grupo PTX (µg/kg)</b>	< 2,517	< 2,517	< 2,517	< 2,517



**Figura 20.** Toxinas del grupo de las YTX mes de Octubre.

**Fuente:** Tabla 27

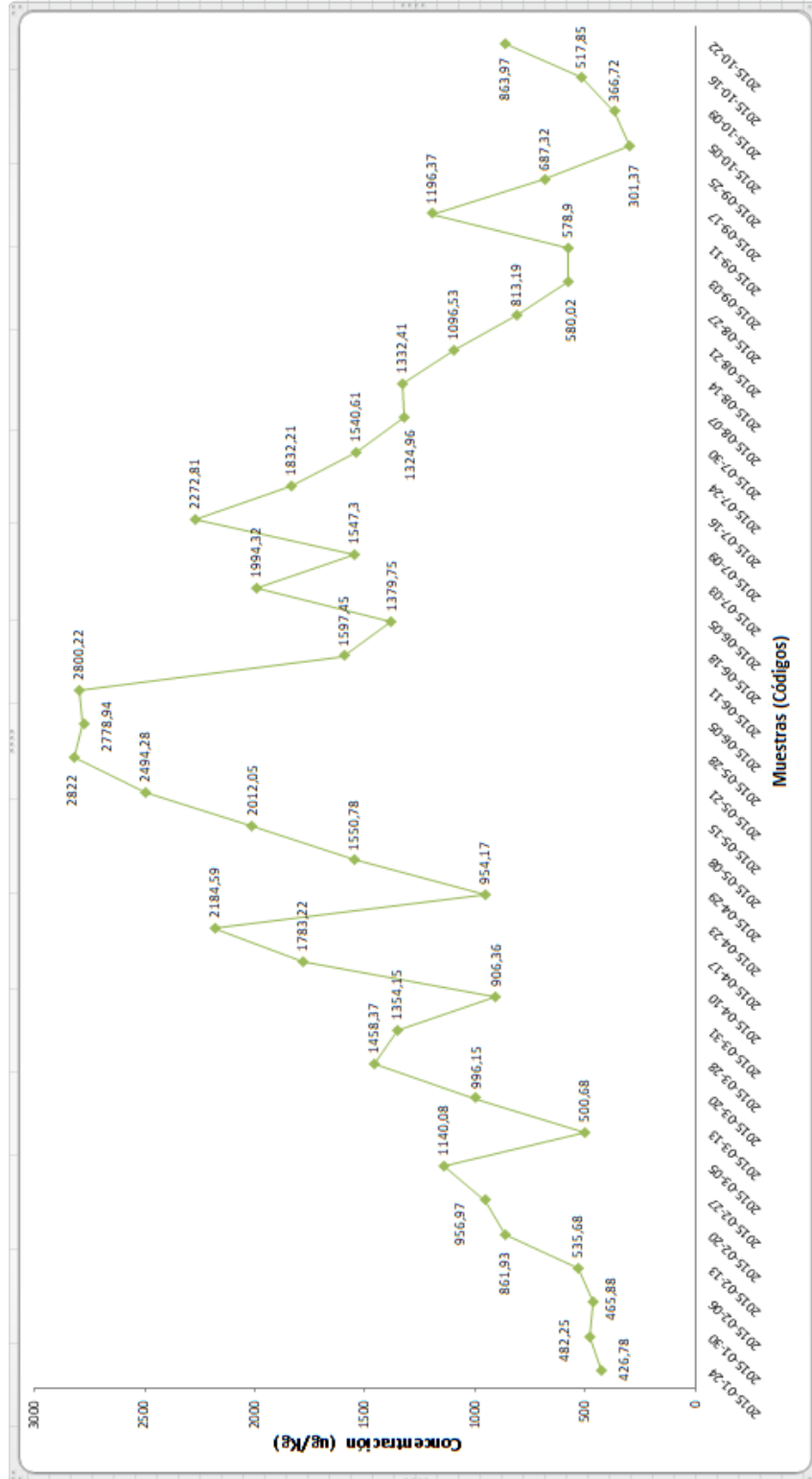


Figura 21. Concentración de toxinas del grupo YTX en el año 2015

## V. DISCUSIÓN

Este trabajo pretende identificar los grupos de toxinas presentes bajo las regulaciones de la Unión Europea por ser el mercado de mayor exportación para el Perú, así como sus concentraciones en un evento tóxico que se presentó en el año 2015 en la bahía Samanco-Ancash que produjo el cierre de la zona de extracción a estudiar y perjudicando a los maricultores por alrededor de 1 año.

El bioensayo en ratón fue considerado el método de referencia hasta el 31 de diciembre del 2014 (EU, 2011), a partir de dicha fecha el método mandatorio y de referencia es el método de cromatografía líquida acoplado a un detector de masas en Tándem (LC-MS/MS). Por encontrarse el Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) y los laboratorios de apoyo del Perú en etapa de migración al método químico por aquella fecha, se continuó realizando el método biológico (bioensayo en ratón) pero durante un tiempo limitado. Luego el método biológico pasaría a utilizarse durante controles periódicos de las zonas de producción para detectar toxinas marinas nuevas o desconocidas. Esto debido a que el bioensayo en ratón proporciona un valor del contenido total de toxinas basado en la medición de una única respuesta, biológica o bioquímica, que engloba la actividad de todos los congéneres presentes

en la muestra. Por esta razón las desventajas de este ensayo son, la falta de especificidad (no hay diferencia entre los distintos componentes de las toxinas DSP), la subjetividad del tiempo de muerte de los animales y la necesidad de contar con animales de laboratorio para sacrificarlos posteriormente. Además, el ensayo requiere mucho tiempo, es costoso y puede resultar en falsos positivos por interferencia de otros lípidos (SUZUKI *et al.* 1998). Mientras que el método LC-MS/MS realiza la separación, identificación y posterior cuantificación individual de las toxinas en función de una respuesta instrumental que es proporcional a la concentración de cada una de las toxinas presentes en la muestra. Para lo cual se requiere una previa calibración del equipo con patrones de concentraciones conocidas de cada una de las toxinas objetivo de determinación.

Para el año 2015, por ser el límite legislado para el grupo de las Yesotoxinas de 3,75 mg/Kg (3750 µg/Kg) equivalente a Yesotoxinas, el bioensayo en ratón quedó obsoleto ya que los ratones presentan muertes en concentraciones alrededor de los 160 µg/Kg equivalente de Yesotoxinas, lo que produjo en su momento la incertidumbre de no poder cuantificar y determinar la cantidad de toxinas presentes y poder discernir entre un falso positivo o un positivo. Para ese momento que aún se

optaba por el bioensayo en ratón, donde la muerte de 2 de 3 ratones dentro de las 24 horas era considerado como un resultado positivo.

Como se observa en los resultados obtenidos (tablas de la 19 a la 28), el único grupo de toxinas lipofílicas presente y que pudo ser cuantificado en las muestras fue el grupo de las Yesotoxinas. Esto no indica la ausencia de las toxinas de los demás grupos ya que podrían estar presentes en concentraciones menores a los límites de cuantificación.

El grupo de las Yesotoxinas fue encontrado en todas las muestras en concentraciones mayores a 160  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  equivalente de yesotoxina. Esto confirma las sospechas de la presencia de dicho grupo de toxinas y que este grupo sea el responsable de los resultados positivos obtenidos por bioensayo en ratón en el año 2015. La concentración máxima encontrada en todas las muestras fue de 2822,00  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  equivalente a Yesotoxina, lo que es un valor inferior a los 3,75 mg/Kg (o 3750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) equivalente de yesotoxina legislado por la Unión Europea. Esto da a entender que los resultados reportados por bioensayo en ratón fueron falsos positivos por no sobrepasar el límite legislado.

Diferentes países han reportado la presencia de yesotoxinas en moluscos bivalvos con concentraciones variables, Norway con

concentraciones de 0,5 – 14,8 µg/g equivalente a Yesotoxinas (LEE *et al.*, 1988; AASEN *et al.*, 2005), Italia con concentraciones de 0,1 – 9,0 µg/g equivalente a Yesotoxinas (Ciminiello *et al.*, 1997), Nueva Zelanda con concentraciones de 1,6 a 3,2 µg/g equivalente a Yesotoxinas (Yasumoto y Takizawa, 1997), Rusia con concentraciones de 0,053 µg/g equivalente a Yesotoxinas (Vershinin *et al.*, 2006), California con concentraciones de 0 a 0,10 (Howard, M., Silver, M. y Kidela. R., 2008).

Certificaciones del Perú S.A. por ser en dicha fecha laboratorio de apoyo, se encargaba del análisis tanto de las toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón como de los recuentos del fitoplancton potencialmente tóxico. Para el año 2015 se observó una floración algal de *Protoceratium reticulatum* que comenzó en el mes de enero alcanzando en su máximo una concentración de 8360 cel/L. *Protoceratium reticulatum*, *Lyngulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera* son algas productoras de YTXs (Lesley *et al.* 2006), Se ha reportado a *P. reticulatum* como productor de Yesotoxinas en Canadá con concentraciones de 5,0 pg/Cell (Stobo *et al.*, 2003), Italia con concentraciones de 5,83 pg/Cell (Boni *et al.*, 2002), Norway con concentraciones de 18 – 79 pg/Cell (Samdal *et al.*, 2004), Japón con concentraciones de 0,9 – 14,0 pg/Cell (Satake *et al.*, 1999), Nueva Zelanda con concentraciones de 3,0 a 13,0 pg/Cell (Satake *et al.*, 1996, 1999), España en concentraciones de 0 a 2,6 pg/Cell (PAZ *et*

*al.*, 2004), Reino Unido con concentraciones de 0,3 pg/Cell (Stobo *et al.*, 2002) y Estados Unidos con concentraciones de 0 a 2,1 pg/Cell (PAZ *et al.*, 2004). También se ha reportado a *L. polyedrum* como productor de Yesotoxina en Irlanda 0,3 pg/Cell (Silke, datos no publicados), Italia con concentraciones de 1,5 pg/Cell (Tubaro *et al.*, 1998), España con concentraciones de 0 a 0,3 pg/Cell (Paz *et al.*, 2004), Reino Unido en concentraciones de 0 a 0,02 pg/Cell (Stobo *et al.*, 2003) y California en concentraciones de 0 a 0,005 pg/Cell (Armstrong y Kudela, 2006) y a *Gonyaulax spinifera* como productor de Yesotoxinas en Nueva Zelanda 0 a 200 pg/Cell (Rhodes *et al.*, 2005).

Se sabe que *Protoceratium reticulatum* usualmente produce Yesotoxinas y homoyesotoxinas (Paz *et al.*, 2008), lo que hace sospechar que dicha alga podría ser la responsable de la presencia de yesotoxina y homoyesotoxina en *Argopecten purpuratus* en el año 2015.

Existen estudios realizados en diferentes moluscos bivalvos de importancia comercial donde se observa las biotransformaciones que sufren las diferentes toxinas lipofílicas gracias al metabolismo propio del molusco (Aasen *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2001; Satake *et al.*, 1996, Morohashi, A., Satake, M., Oshima, Y. y Yasumoto, T., 2000; Satake, *et al.*, 1997b; Ciminiello, *et al.*, 1998; Daiguji, *et al.* 1998b). En este estudio

se comprobó la presencia de 2 de las 4 toxinas legisladas para el grupo de las Yesotoxinas (yesotoxina y homoyesotoxina). Por no encontrarse las otras 2 toxinas pertenecientes al grupo de las Yesotoxinas (45-hidroxiyesotoxina y 45-hidroxihomoyesotoxina), se podría concluir que *Argopecten purpuratus* es un organismo con un bajo o nulo índice de biotransformación para esas dos toxinas pertenecientes al grupo de las Yesotoxinas.

En el Perú, lamentablemente, las investigaciones sobre toxinas marinas, algas tóxicas y el potencial de detoxificación de los moluscos bivalvos no han alcanzado los niveles de otros países, se sabe que los moluscos bivalvos presentan sus propios mecanismos de detoxificación (Gueguen *et al*, 2010; Blanco *et al*, 2007; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2010)) y las toxinas Lipofílicas presentan una distribución anatómica al momento de ingresar en los moluscos bivalvos donde la mayor concentración de toxina está presente en el hepatopáncreas (Yasumoto y Takizawa, 1997) por ser el aparato digestivo presente en los moluscos bivalvos.

Lamentablemente las intoxicaciones masivas con víctimas fatales donde se encontraron involucradas las toxinas marinas fueron los detonantes a nivel mundial para el desarrollo de metodologías para su

identificación y cuantificación, así como el inicio de diversas investigaciones para encontrar a las algas productoras de dichas toxinas y conocer en diferentes países las toxinas presentes en sus litorales. El Perú sólo se dedica al control sanitario de productos hidrobiológicos que están destinados al mercado exterior, dejando de lado la producción y el consumo interno, esto conlleva al poco conocimiento de las toxinas marinas presentes en nuestro litoral, así como las algas productoras de dichas toxinas y los factores medio ambientales que favorecen su proliferación ocasionando las floraciones algales nocivas.

Para el muestreo, Certificaciones del Perú S.A. y la autoridad sanitaria SANIPES siguieron el protocolo establecido por la entidad sanitaria, el cual indica para la toma de muestra, no discriminar el tamaño de *Argopecten purpuratus* al momento de ser recogido. De igual forma al llegar al laboratorio, el método de análisis indica homogenizar la muestra, un aproximado de 100 a 150 gramos de pulpa sin importa el tamaño. Esto podría indicar la variabilidad de las concentraciones obtenidas en las muestras analizadas pues *Argopecten purpuratus* al encontrarse en estadios jóvenes presenta una mayor actividad filtradora y por lo tanto una mayor acumulación de toxinas, mientras que los estadios mayores, presentan una menor actividad filtradora y por tanto una menor acumulación. Así mismo, las concentraciones de toxinas encontradas en

las muestras podrían indicar el potencial de detoxificación de *Argopecten purpuratus*, pues a partir del mes de Agosto se observa una tendencia a disminuir las concentraciones de las toxinas encontradas que concuerda con el fin del evento toxico que tuvo lugar en el año 2015.

## VI. CONCLUSIONES

- Los análisis para toxinas lipofílicas de las 40 muestras de *Argopecten purpuratus* recolectadas en el año 2015 de la bahía Samanco-Ancash que dieron positivo por bioensayo en ratón demostraron la presencia de toxinas pertenecientes al grupo de las Yesotoxinas.
- El valor más bajo cuantificado para la yesotoxina fue de 233,51  $\mu\text{g/Kg}$  en el mes de octubre para la muestra con código 2015-10-05 mientras que el valor más alto fue de 2050,11  $\mu\text{g/Kg}$  en el mes de junio para la muestra con código 2015-06-11.
- El valor más bajo cuantificado para la homoyesotoxina fue de 111,48  $\mu\text{g/Kg}$  en el mes de enero para la muestra con código 2015-01-24, mientras que el valor más alto fue de 815,82  $\mu\text{g/Kg}$  en el mes de mayo para la muestra con código 2015-05-28.
- El grupo de las Yesotoxinas presento como valor más bajo 301.37  $\mu\text{g/kg}$  en el mes de octubre para el código 2015-10-05, mientras como valor más alto 2822.00  $\mu\text{g/Kg}$  para el mes de mayo para la muestra con código 2015-05-28.

## VII. RECOMENDACIONES

- El “Procedimiento operativo estándar armonizado de la UE para la “Determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS” nos da como opciones el uso de condiciones cromatográficas ácidas y condiciones cromatográficas alcalinas. En el presente trabajo se realizaron pruebas con ambas condiciones observándose una mejor señal e intensidad de los analitos en las condiciones alcalinas. Cada equipo LC-MS/MS puede responder diferente a dichas condiciones por lo cual se recomienda realizar pruebas con ambas condiciones cromatográficas para escoger la más adecuada.
- El presente estudio estuvo enfocado en determinar las toxinas lipofílicas presentes utilizando el procedimiento reconocido por la Unión Europea, este procedimiento está enfocado en determinar la cantidad de toxinas lipofílicas presentes en todo el cuerpo del molusco bivalvo, Como investigaciones adicionales se sugiere realizar el análisis de las diferentes partes del cuerpo del molusco bivalvo por separado, para así poder determinar la distribución de las toxinas lipofílicas en él.

- Es recomendable para futuras investigaciones realizar el análisis de las algas presentes al momento de detectarse la presencia de toxinas lipofílicas en los moluscos bivalvos, esto con el fin de poder establecer el organismo productor de las diferentes toxinas que puedan ser encontradas.
- Se sabe que las toxinas lipofílicas legisladas por la Unión europea no son las únicas existentes, se recomienda para futuras investigaciones, realizar el análisis de las diferentes toxinas que puedan ser adquiridas comercialmente como estándares para así poder determinar las posibles toxinas lipofílicas no legisladas presentes en nuestro litoral.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C., Dahl, E., Briggs, L., Aune, T. (2005). Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon* 45, 265-272.
2. Alcazar, J., Mendo, J. (2008). Crecimiento y supervivencia de *Argopecten purpuratus* en sistemas de fondo y suspendido en la zona de Casma, Perú. *Ecol. Apl*, 7, 1-10.
3. Alfonso A., de la Rosa, I., Vieytes, M., Yasumoto, T., Botana, L. (2003). Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* 65, 193-208.
4. Anderson, D., Andersen, P., Bricelj, V., Cullen, J., Rensel, J. (2001). Monitoring and management strategies for Harmful Algal Blooms in coastal waters. *APEC #201-mr-01.1*. Asia Pacific Economic Program Singapore and Intergovernmental Oceanographic Commission, París, pp. 268.

5. Anderson, D. (2007). The ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: Multidisciplinary Approaches to Research and Management. IOC/2007/TS/74. 1-28.
6. Arellano, M. (2005). Características ecofisiológicas de la producción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (Pectinidae) en la Laguna Ojo De Liebre, B.C.S., México
7. Arevalo, F., Pazos, Y., Correa, J., Salgado, C., Moroño, A., Paz, B., Franco, J. (2006). First report of yessotoxins in mussels of Galician Rias during a bloom of *Lingulodinium polyedra* STEIN (Dodge). In: Henshilwood, K., Deegan, B., McMahon, T., Cusack, C., Keaveney, S., Silke, J., O'cinneide, M., Lyons, D., Hess, P. (Eds). V International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS), Galway, Ireland, 184-489.
8. Armstrong, M., y kudela, R. (2006). Evaluation of california isolates of *Lingulodinium polyedrum* for the production of yessotoxin. Afr. J. Mar. Sci. 25(2), 399-401.
9. Aune, T., Sorby. R., Yasumoto, T., Ramstad H., Landsverk, T. (2002). Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon*, 40, 77-82.

10. Aune, T., y Yndstad, M. (1993). Diarrhetic shellfish poisoning, in Algal toxins in seafood and drinking water. (FALCONER, I. R., Ed.). 87-104.
11. Avendaño, M., Cantillanez, M. (1996). Efecto de la pesca clandestine, sobre *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en el banco La Rinconada II Región. Cienc. Tec. Mar. 19: 57-65.
12. Bandin, R., Mendo, J. (1999). Asentamiento larval de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en colectores artificiales en la Bahía Independencia, Pisco, Perú. Investigaciones Marinas. 27: 3-13. Valparaiso.
13. Barber, B., y Blake, N. (2006). Reproductive Physiology In: Shumway, SE. Parsons, GJ. (Eds), Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Development in Aquaculture and Fisheries Science (35): 357-416.
14. Barriles, D., Gaete, U. (1991). Induction of sperm release in the scallop *Argopecten purpuratus* (bivalvia: Pectinidae) using serotonin (5-hidroxytriptamine). Malacol. Rev 24 (1-2), 19-24.

15. Bell, G. (1961). Penetration of spines from a marine diatom into the gill tissue of lingcod (*Ophion elongatus*). *Nature* 192: 279-280.
16. Bellolio, G., Toledo, P., Campos, B. (1994). Morfología de la concha larval y postlarval del ostión *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia, Pectinidae) en Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat* 67, 229-237.
17. Beninger, P., Le Pennec, M., Donval, A. (1991). Mode of particle ingestion in five species of suspension-feeding bivalve molluscs. *Marine Biology*, 108(2), 255-261.
18. Bermudez, P., y Aquino, H. (2004). Manual de cultivo suspendido de concha de abanico. AECI/PADESPA – FONDEPES, Lima, Perú.
19. Bialojan, C., y Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* 256, 283-290.
20. Bianchi, C., Fato, R., Angelin, A., Trombetti, F., Ventrella, V., Borgatti, A., Fattorusso, E., Ciminiello, P., Bernardi, P., Lenaz, G., Parenti, C. (2004). Yessotoxin, a shellfish biotoxin, is a potent inducer of the permeability transition in isolated mitochondria and

intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1656, 139-147.

21. Blanco, J., (2001). Episodios nocivos por Fitoplancton. In: A.N. Maeda-Martinez, (Ed.). *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, México. 285-324.
22. Blanco, J., Moroño, A., Fernandez, M. (2005). Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Monog.)* 1:70.
23. Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C. (2007). Anatomical distribution of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 50(8), 1011-1018.
24. Boni, L., Ceredi, A., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., Poletti, R., Pompei, M. (2000). Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridinales, dinophyta) in the North-Western Adriatic Sea (Italy). In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I. Bolch, C.J. and Lewis, R.J. (Ed.), *Harmful Algal Blooms 2000*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2001.

25. Boni, L., Ceredi, A., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., Poletti, R., Pompei, M. (2002). Toxic *Gonyaulax grindley* Reinecke in the North-Western Adriatic Sea (Italy). 10<sup>th</sup> International Harmful Algal Bloom Conference. St. Petersburg, FL. USA (Abstract).
26. Bourne, N., Hodgson, C., Whyte, J., Station, P. (1989). A manual for scallop culture in British Columbia. Departament of Fisheries and Oceans, Biological Sciences Branch, Pacic Biological Station.
27. Brown, D., Guerra, R. (1980). Recuperación gonadal en Ostión (*Argopecten*) *purpuratus* (Lamarck 1819) luego de evaluación de gametos. Archivo de Biología Y Medicina Experimental. Sociedad de Biología de Chile, 13, 363.
28. Brownlee, E., Sellner, G., Sellner, K. (2005). *Prorocentrum minimum* Blooms: Potential impacts on dissolved oxygen and Chesapeake Bay oyster settlement and growth. *Harmful Algae* 4: 593-602.
29. Burgess, V., y Shaw, G. (2001). Pectenotoxins an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environ Internat* 27, 275-283.
30. Cabrini, M., Fonda, D., Honsell, G. (1992). Mucilaginous aggregates in the Gulf of Trieste (Northem Adriatic Sea): analysis of

the phytoplankton communities in the period June-August 1989.  
*En: Vollenweider, R.A., MARCHETTI, R., VIVIANI, R. [Eds.]. Marine coastal eutrophication. Elsevier, Amsterdam, pp. 557-568.*

31. Campos, M., Fraga, S., Mariño, J., Sanchez, F. (1982) Red tide monitoring program in NW Spain. Report of 1977-1981.
32. Cañamero, L. (2007). Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos.
33. Carver, C., Mallet, A., Warnock, R., Douglas, D. (1996). Red-coloured digestive glands in cultured mussels and scallops: the implication of *Mesodinium rubrum*. *Journal of Shellfish Research* 15: 191-201.
34. Chavez, G., Ishimaya, V. (1989). Reproducción de *Argopecten purpuratus* en la bahía Independencia (Pisco-Perú). In: Memorias del Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesqueras en el Pacífico Sudeste.
35. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R. and Yasumoto, T. (1997). Yesotoxin in mussels of the Northern Adriatic SEA. *Toxicon*, 35: 177-83.

36. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. and Viviani, R. (1998). Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin, from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett.*, 39: 8897-900.
37. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. and Viviani, R. (1999). Isolation of 45-hydroxyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Toxicon*, 37: 689-93.
38. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Viviani, R. (2000). A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic Sea mussels. *European Journal of Organic Chemistry* 2000, 291-295.
39. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Viviani R. (2000). Structure determination of carboxyhomoyessotoxin, a new yessotoxin analogue isolated from Adriatic mussels. *Chemical Research in Toxicol.* 13, 770-774.
40. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R. (2001). 42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxohomoyessotoxin, a new

biotoxin from mussels of the northern Adriatic Sea. *Chemical Research in Toxicology* 14, 596-599.

41. Ciminiello, P., Dell-Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. (2002a). The detection and identification of 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from Adriatic shellfish, by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 15, 979-984.
42. Ciminiello, P., Dell'aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Guerrini, F., Pistocchi, R. Boni, I. (2003). Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from northeastern Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon*, 42(1): 4-14.
43. Ciminiello, P., Dell-Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Guerrini, F., pistocchi, R., Boni, L. (2003b). Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon* 42, 7-14.
44. Ciminiello, O. y Fattorusso, E. (2004). Shellfish toxins-chemical studies on northerm Adriatic mussels. *Eur. J. Org. Chem*, 2533-2551.

45. Ciminiello, P., Dell-Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Magno, S., Politti, R., Tartaglione, L. (2007). Desulfoyessotoxins from Adriatic Mussels: a new problem for seafood safety control. *Chemical Research in toxicology* 20, 95-98
46. Clement, A. (1994). Harmful blooms of *Leptocylindrus minimus* in Southern Chile. *Harmful Algae News* 8:1.
47. Cocho De Juan, J. (2007). Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos.
48. Cohen, P., Holmes, C., Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15:98-102.
49. Crespo, B., Figueiras, F. (2007). Role of across-shelf currents in the dynamics of harmful dinoflagellate blooms in the northwestern Iberian upwelling. *Limnol. Oceanogr.* 52, 2668-2678.
50. Dahl, E., Lindahl, O., Paasche, E., Throndsen, J. (1989). The *Chrysochromulina polylepis* bloom in Scandinavian waters during

spring 1988. *En*: COSPER, E.M., BRICELJ, M., CARPENTER, E.J. [Eds.]. *Novel phytoplankton Blooms; causes and impactsof recurrent brown tides and other unusual blooms*. Spring-Verlag, Berlin, pp. 383-405.

51. Daiguji, M., Satake, M., Ramstad, H., Aune, T., Naoki, H., Yasumoto, T. (1998b). Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoyessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway. *Natural Toxins* 6, 235-239.
52. De La Rosa, L., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M.R., Botana, L. (2001). Modulation of cytosolic calcium level of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochemical Pharmacology* 61, 827-833.
53. Diario Oficial de la Union Europea. (2011). Reglamento (UE) N° 15/2011 de la comisión de 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. 5.
54. Diario Oficial de la Union Europea. (2013). Reglamento (UE) N° 786/2013 de la comisión de 16 de agosto de 2013 por el que se

modifica el anexo III del Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites autorizados de Yesotoxinas en moluscos bivalvos vivos.

55. Disalvo, L., Alarcón, E., Martínez, E., Uribe, E. (1984). Progress in Mass Culture of *Chlamys (Argopecten) purpuratus* Lamarck (1819) with Notes on its Natural history. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 57, 35-45.
56. Donald, M. (2010). The IOC International Harmful Algal Bloom Program. *Oceanography* 23(3), 73.
57. Dorange, G., Le Pennec, M. (1989). Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of ST. Brieuc. *Mar. Biol.* 348, 339-348.
58. Draisci, R., Palleschi, L., Giannetti, L., Lucentini, L., James, K.J., Bishop, A., Satake, M., Yasumoto, T. (1999b). New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 847, 213-221.
59. Eiki, K., Satake, M., Koike, K., Ogata, T., Mitsuya, T., Oshima, Y. (2005). Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate

*Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. Fisheries Science 71, 633-638.

60. European Food Safety Authority (EFSA). (2008b). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. *The EFSA Journal* 589: 1-62.
61. European Food safety Authority (EFSA). (2009b). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – pectenotoxin group. *The EFSA Journal* 1109:1-47.
62. European Food Safety Authority (EFSA). (2009c). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. *The EFSA Journal* 1306: 1-23.
63. EU-RL-MB. (2015). EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. Version 5.

64. Fernandez, M., Miguel, A., Cacho, E., Martinez, A., Diogenes, J. & Yasumoto, T. (2002). Floraciones algales nocivas en el cono sur americano. p.79.
65. Fernandez, M., Miguez, A., Martinez, A., Moroño, A., Arevalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., Gonzales, S., Reguera, B. (2003a). First report of pectenotoxin-2 in phytoplankton net-hauls and mussels from the Galician Rias Baixas (NW Spain) during proliferations of *Dinophysis acuta* and *Dinophysis caudate*. *En: VILLALBA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., BEIRAS, R. [Eds.] Molluscan Shellfish Safety*. Conselleria de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 75-83.
66. Fernandez, P., Fidalgo, M., Hamilton, B., Furey, A., James, K.J. (2004). Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, *Dinophysis acuta*, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 44:919-926.
67. Fernandez, M., Reguera, B., Gonzales, S., Miguez, A. (2006). Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and

*Dinophysis acuta* from the Galician Rías 8NW Spain). *Toxicon* 48:477-490.

68. Ferrari, S., Ciminiello, P., Dell-Aversano, C., Forino, M., Malaguti, C., Tubaro, A., Poletti, R., Yasumoto, T., Fattorusso, E., Rossini, G. (2004). Structure Activity relationships of yessotoxins in cultured cells. *Chemical Research in Toxicology* 17, 1251-1257
69. Finch, S., Wilkins, A., Hawkes, A., Jensen, D., Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Quilliam, M., Olseng, C., Samdal, I., Aasen, J., Selwood, A., Cooney, J., Sandvik, M., Miles, C. (2005). Isolation and identification of (44-r, s)-44,55-dihidroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon* 46, 160-170.
70. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2005). *Biotoxinas marinas*. p 2.
71. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2010). Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. Documento técnico de pesca (511)

72. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2011). *Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs*. p. 193.
73. Fonfria, E. (2009). Ficotoxinas marinas: métodos de detección de extractos de moluscos, Tesis doctoral. 09-10
74. Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., Ottaviani, E., (2004). Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice. *Toxicon*, 43, 347-352.
75. Gentien, P., Arzul, G. (1990). Exotoxin production by *Gyrodinium cf. aureolum* (Dinophyceae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70:571-581.
76. Giacobbe, M., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R., Yang, X. (2000). Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). *Phycologia.*, 39(3): 177-182.
77. Gosling, E., (2003) Bivalve: Molluscs Biology, Ecology and Culture.
78. Gueguen, M., Baron, R., Duinker, A., Aasen, J., Naustvoll, I.J. (2010). Modelling the environmental variable influences on the

detoxification kinetics on mussels *Mytilus edulis* containing lipophilic toxins.

79. Guzman, N., Saa, S., Ortlieb, L. (1998). Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gasterópoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23 S (Chile). *Estudios Oceanográficos*, 17, 17-86.
80. Hallegraeff, G. (1993). A review of harmful algal Blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79-99.
81. Hallegraeff, G. (1995). Harmful algal blooms: a global overview. *En: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M., CEMBELLA, A. [Eds.]. Manual on Harmful Marine Microalgae UNESCO, París pp. 1-22.*
82. Hallegraeff, G. (2004). Harmful algal blooms: a global overview. *En: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M., CENBELLA, A. [Eds.] Manual on harmful Marine Microalgae. UNESCO, Paris, pp. 25-50*
83. Hamano, Y., Kinoshita, Y., Yasumoto, T. (1986). Enteropathogenicity of Diarrhetic Shellfish Toxins in intestinal models. *J. food Hyg. Soc. Japan.* 27:375-379.
84. Hernandez, J. (2005). Cromatografía líquida de alta eficacia. *Ed Cont Lab Clin.* 8:49-62

85. Herndl, G. (1992). Marine snow in the northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for a shallow ecosystem, *Mar. Microb. Food Webs* 6: 149-172.
86. Hess, P., Aasen, J.A.B. (2007). Chemistry, origins and distribution of Yessotoxin and its analogues. In *Chemistry and Biochemistry of Marine Biotoxins* (Botana L. ed). Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.
87. Horner, R., Postel, J., Rensel, J. (1990). Noxious phytoplankton blooms in Western Washington waters. A review. *En: GRANALI, E., SUNDSTROM, B., EDLER, L., ANDERSON, D.M. [Eds.]. Toxic marine phytoplankton. Elsevier, New York, pp. 171-176.*
88. Howard, M., Silver, M. y Kidela., R. (2008). Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast.
89. Hu, T., Curtis, J., Walter, J., Wright, J. (1995). Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum Lima*. *Chem. Soc. Chem. Commun* 5:597-599.

90. Instituto del Mar del Perú (IMARPE). (2009). Estudio de línea base en el ámbito marino de bahía de Samanco 13-24 diciembre 2008.
91. Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahon, T., James, K., Yasumoto, T. (2000). Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38: 917-930.
92. Ito, E., Frederick, M., Koftis, T., Tang, W., Petrovic, G., Ling, T., Nicolaou, K. (2006). Structure toxicity relationships of synthetic azaspiracid-1 and analogs in mice. *Harmful Algae* 5:586-591
93. James, K., Bishop, A., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M., Yasumoto, T. (1999). Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *Journal of Chromatography, A* 844:53-65.
94. James, K.J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A. (2003). Ubiquitous “benign” alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41:145-151.

95. James, K., Sierra, M., Lehane, M., Magdalena, A., Furey, A. (2003). Detection de five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tándem mass spectrometry. *Toxicon* 41:277:283.
96. James. K., Fidalgo Saez. M., Furey. A and Lehane. M. (2004). Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption. *Food Addit Contam* 21, 879-892.
97. Kahru, M., Mitchell, B., Diaz, A., Miura, M. (2004). MODIS detects a devastating algal bloom in Paracas Bay, Perú. *EOS, Transactions American Geophysical Union* 85: 465-472.
98. Kat, M. (1979). The occurrence de *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers, In *Toxic dinoflagellate blooms*. (TAYLOR, D. & SELINGER, H., Eds.) pp 215-220. Elsevier, Amsterdam.
99. Kat, M. (1984). "Red" oysters (*Ostrea edulis*) caused by *Mesodinium rubrum* in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 38: 375-377.

100. Krock, B., Tillmann, U., Jhon, U., Cembella, A. (2009b). Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8: 254-263.
101. Kudela, R., Pitcher, G., Probyn, T., Figueiras, F., Moita, T., Trainer, V. (2005). Harmful algal blooms in coastal upwelling systems. *Oceanography* 18, 184-197.
102. Landsberg, J. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Res. Fish. SCI.* 10, 113-390.
103. Larsen, K., Petersen, D., Wilkins, A., L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Rundberget, T., Goldstone, D., Arcus, V., Hovgard, P., Rise, F., Rehmann, N., Hess, P. y Miles, C. (2007). Clarification of the C-35 stereochemistries of dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 and its consequences for binding to protein phosphatase. *Chem Res Toxicol* 20, pp 868-875.
104. Lawrence, J., Loreal, H., *et al.* (2011). Assessment and management of biotoxin risk in bivalve molluscs. p.3.

105. Lee, J., Tangen, K., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T, (1988). Diarrhetic shellfish toxins in Norwegian mussels. *Nippon Suisan Gakkaishi/Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 54, 1953-1957.
106. Lee, J., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. y Yasumoto, T. (1989) Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellatespecies. *Journal of Applied Phycology* 1, pp 147-152.
107. Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J., Vieytes, M., Botana, L., Yasumoto, T., Malaguti, C., Rossini, G., (2002b). Characterization of faction depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 63. pp 1979-1988.
108. Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J., Vieytes, M., Botana, L., Yasumoto, T., Malaguti, C., Rossini, G., (2002b). Characterization of faction depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 63. pp 1979-1988.
109. Lesley, R., Mcnabb, M., De Salas, L., Briggs, V., Beuzenberg, M., Gladstone. (2006). Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5: 148-155

110. Lush, G., Hallegraeff, G., Munday, B. (1998). Histopathological effects in juvenile greenback flounder, *Rhombosolea taparina* exposed to the toxic Dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *En: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L., Wyatt, T. [Eds.]. Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO Vigo, Spain.
111. Mackenzie, L., Suzuki, T., Adamson, J. (2001). Elimination and differential transformation of yessotoxin by the greenshell mussel *Perna canaliculus* and the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. In: HALLEGRAEFF, G.M., BLACKBURN, S.I., BOLCH, C.J. LEWIS, R.J.(Ed). *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 371-374.
112. Mackenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T. (2002). Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40, 1321-1330.
113. Margalef, R. (1998). Red tides and ciguatera as successful ways in the evolution and survival of an admirable old phylum. *En: REGUERA, B., BLANCO, J., FERNANDEZ, M.L., WYATT, T. [Eds.]*

*Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, pp 3-7.

114. McMahon, T. y Silke, J. (1996). Winter toxicity of unknown etiology in mussels. *Harmful Algae News* 14, 2.1998. Re-occurrence of winter toxicity. *Harmful Algae News* 17. 12-16.
115. Mendo, J., Yamashiro, C., Rubio, J., Kameya, A (1989). Evaluación de la población de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la Bahía Independencia, Pico, Perú. Informe progresivo IMARPE.
116. Mendo, J. Wolff, M. (2003). El impacto de El Niño sobre la producción de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Ecología Aplicada*. 2(1): 51-57.
117. Mendo, J., Wolff, M., Carbajal, W., Gonzales, I. y Badjeck, M. (2008). Manejo y explotación de los principales bancos naturales de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto

Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma. FAO. Pp. 101-114.

118. Mendo, J., Ysla, L., Orrego, H., Miglio, M., GIL, P., Del Solar, A. (2011). Manual técnico para el repoblamiento de concha de abanico en la Bahía de Sechura. 100pp.
119. Miles, C., Wilkins, A., Munday, R., Dines, M., Hawkes, A., Briggs, L., Sandvik, M., Jensen, D., Cooney, J., Holland, P., Quilliam, M., Mackenzie, A., Beuzenberg, V., Towers, N. (2004a). Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43:1-9.
120. Miles, C., Samdviik, M., Petersen, D., Quilliam, M., Naustvoll, L., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D., Samdal, I., Cooney, J. (2004b). A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. And shellfish from Norway. *Toxicon*, 17: 1423-1433.
121. Miles, C., Samdal, I., Aasen, J., Jensen, D., Quilliam, M., Petersen, D., Briggs, L., Wilkins, A., Rise, F., Cooney, J., Mackenzie, L. (2005). Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4, 1075-1091.

122. Miles, C., Wilkins, A., Hawkes, A., Jensen, D., Selwood, A., Beuzenberg, V., Mackenzie, A., Cooney, J. and Holland, P. (2006). Isolation and identification of pectenotoxinas-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon*, 48:152-159.
123. Miles, C., Wilkins, A., Selwood, A., Jensen, D., Cooney, J., Beuzenberg, V., Mackenzie, A. (2006a). Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47, 229-240.
124. Ministerio de la Producción. (2011). Informe: "Panorama de la acuicultura mundial, América Latina y el Caribe y en el Perú.
125. Moestrup, O., Codd, G., Elbrachter, M., Faust, M., Fraga, S., Fukuyo, Y., Cronberg, G., Halim, Y., Taylor, F. y Zingone, A. (2004). Taxonomic reference list of toxic algae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. <http://ioc.unesco.org/hab/data.htm>
126. Morohashi, A., Satake, M., Oshima, Y. y Yasumoto, T. (2000). Absolute configuration at C45 in 45-hydroxyessotoxin, a marine

- polyether toxin isolated from shellfish, *Biosci. Biotech, Biochem*, 5, 107.
127. Munday, R. (2006). Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: a review. *Harmful Algae* 2004. *African Journal of Marine Science* 28, 447-449.
128. Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48: 549-552.
129. Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S. y Yasumoto, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett* 28, 5869-5872.
130. Nicolaou, K., Koftis, T., Vyskocil, S., Petrovig, G., Tang., W., Frederick, M., Chen, D., LI, y., Ling, T., Yamada, Y. (2006a). Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2859-2872.

131. Nicolaou, K., Frederick, M., Petrovic, G., Cole, K., Loizidou, E.. (2006b). Total synthesis and confirmation of the revised structures of Azaspiracid-2 and Azaspiracid-3. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 2609-2615.
132. Ofuji, M., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K., Noaki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. (1999). Two analogs of azaspiracids isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Natural Toxins* 7:99-102.
133. Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. (1999a). Two analogues of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat, Toxins*, 7:99-102.
134. Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T. (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins* 5, 255-259.
135. Parry, G., Langdon, J., Huisman, J. (1989). Toxic effects of a bloom of the diatom *Rhizosolenia chunii* on shellfish in Port Phillip Bay, Southeastern Australia. *Marine Biology* 10 2:25-41.
136. Pavela, M., Mestrovic, V., Marasovic, I., Gillman, M., Furey, A., James, K. (2002). DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40: 1601-1607.

137. Paz, B., Riobo, P., Fernandez, M., Fraga, S., Franco, J. (2004). Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44, 251-258.
138. Paz, B., Riobo, P., Ramilo, I., Franco, J. (2007). Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* Accepted Feb 2007.
139. Paz, B., Daramas, A., Norte, M., Riobo, P., Franco, J. M. and Fernandez, J. J. (2008). Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar Drugs* 6, 73-102.
140. Peña, J. (2001). Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los pectínidos iberoamericanos. *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*, 1-25.
141. Reguera, B. (2002). Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas EN: SAR, E., Ferrario, M.E., Reguera, B. [Eds.]. *Floraciones Algales en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, pp. 19-54.

142. Reguera, B., Pizarro. (2008). Planktonic dinoflagellates which produce polyeter toxins of old <<DSP complex>>. *En: BOTANA, L.M. [Ed.] Seafood and freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, pp. 257-284.
143. Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M. (2008) Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels *Mytilus edulis* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 549-558.
144. Rhodes, L., McNabb, P., Beuzenberg, V. Briggs, I. (2004). *Waitarai Bay G14: Yessotoxin in Greenbell mussels and the dinoflagellate Gonyaulax cf. spinifera*. Report No. 937. Nelson, New Zealand, Cawthron Institute.
145. Rhodes, L., McNabb, P., De Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V. y Gladstone, M. (2005) Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5, 148-155.

146. Roman, G., Martinez, G., Garcia, O., Freites, L. (2001). Reproducción. Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica. Ciencia y Acuicultura 2, 27-59.
147. Sakamoto, S. (1999). Comparison of toxicity and toxin composition among bivalves affected with PSP toxins by the red tide of *Alexandrium catenella* in Tokuyama Bay. *Bull. Fish. Environ. Inland Sea* 1: 55-61.
148. Samdal, I., Aasen, J., Briggs, L., Dahl, E., Miles, C. (2005). Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 46, 7-15.
149. Samdal, I., Naustvoll, L., Olseng, C., Briggs, L., Miles, C. (2004). Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon*, 44:75-82.
150. Samdal, I., Olseng, C., Sandvik, M., Miles, C., Briggs, L., Torgersen, T., Jensen, D., Cooney, J., (2004b). Profiles of yessotoxin analogues in a Norwegian strain of *Protoceratium reticulatum*, 5<sup>th</sup> International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway, Ireland.

151. Sasaki, K., Satake, M., Yasumoto, T. (1997). Identification of the absolute configuration of pectenotoxin-6, a polyether macrolide compound, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, phenylglycine methyl ester. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61: 1783-1785.
152. Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y. y Yasumoto, T. (1996). Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops. *Tetrahedron let* 37, 5955-5958.
153. Satake, M., Mackenzie, L., Yasumoto, T. (1997a). Identification of *Protocerratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* 5, 164-167.
154. Satake, M., Tubaro, A., Lee, J., Yasumoto, T. (1997b). Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Natural Toxins* 5, 107-110.
155. Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. (1998) Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels, *mytilus edulis*, *J. Am. Chem. Soc.*120:9967-9968.

156. Satake, M., Ofuji, K., Naoki., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. (1998b). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:9967-9968.
157. Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S, Oshima, Y. (1999). Confirmation of yessotoxin and 45,46,47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Nat. Toxins*, 7(4): 147-150.
158. Shumway, S., Parsons, J. (2006). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*, Elsevier.
159. Shunway, S., Burkholder, J., Springer, J. (2006). Effects of the Estuarine dinoflagellate *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae) on survival and grazing activity of several shellfish species. *Harmful Algae* 5: 442-458.
160. Smayda, T. (1998). Ecophysiology and Bloom dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *En: ANDERSON, D.M., CEMBELLA, A.D., HALLEGRAEFF, G.M. [Eds.] Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer, Berlin, pp. 113-131.

161. Suarez, M., Hetland, D., Espenes, A., Tranulis, M. y Anue, T. (2006). Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat mouse. *Toxicol. In vitro*, 20, 1077-1087.
162. Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M. (1998). Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *Journal of Chromatography A* 816:155-160.
163. Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography A* 992:141-150.
164. Springer, J., Shumway, S., Burkholder, J., Glasgow, H. (2002). Interactions between the toxic estuarine dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* and two species of bivalve molluscs. *Marine Ecology Progress Series* 245: 1-10.

165. Stobo, L., Lewis, J., Quilliam, M., Hardstaff, W. Gallacher, S., Webster, L., Smith, E., Mckenzie, M. (2003). Detection of yessotoxin in UK and Canadian isolates of Phytoplankton and optimization and validation of LC-MS methods. In: Bates, S. (Ed). 8<sup>th</sup> Canadian workshop on Harmful Marine Algae, Gulf Fisheries Centre, Moncton, New Brunswick, Canada, pp. 8-14.
166. Stotz, W. Gonzalez, S. (1997). Abundance, growth and production of the sea scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819); bases for sustainable exploitation of natural scallop beds in north-central Chile. *Fisheries Research*, 32(2): 173-183.
167. Tachibana, K., Scheuer, P., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Enden, V., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, G. (1981). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus halichondria. *Journal of American Chemical Society*, 103: 2469-2471.
168. Takahashi, H., Kusumi, T., Kan, Y., Satake, M. y Yasumoto, T. (1996). Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy-(2-naphthyl) acetic acid. *Tetrahedron let* 37, 7087-7090.

169. Takano, H. (1956). Harmful blooming of minute cells of *Thalassiosira decepiens* in coastal waters in Tokyo Bay. J. Oceanogr. Soc. Jap. 12.
170. Taleb, H., Vale, P., Amanhir, R., Benhadouch, A., Sagou, R., Chafik, A. (2006). First detection of azaspiracids in mussels in North West Africa. *Journal of shellfish Research* 25:1067-1070.
171. Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M. y Yasumoto, T. (1990). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivate. *Toxicon*, 28, 1095-1104.
172. Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., Yasumoto. (1996). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural change in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24:1141-1151.
173. Tillmann, U., Elbrachter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. (2009). *Azadinium spinosum* Elbrachter et Tillmann gen. et sp. Nov. *European journal of Phycology* 44:63-79.

174. Trainer, V., Pitcher, G., Reguera, B., Smayda, T.J. (2013). The distribution and impact of harmful algal bloom species in eastern boundary upwelling systems. *Progr. Oceanogr.* 85, 33-52.
175. Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R. y Yasumoto, T. (1998). Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from the northern Adriatic Sea. In: B. REGUERA, J. BLANCO, M.L. FERNANDEZ and T. WYATT (eds). Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 470-2.
176. Twiner, M., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G.J. (2008). Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Marine Drugs* 6:39-72.
177. Underdal, B., Yndestad, M., Aune, T. (1985). DSP intoxication in Norway and Sweden, Autumn 1984-Spring 1985. En: ANDERSON, D.M. WHITE, A.W., BADEN, D.G. (Eds), *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, New York, pp. 489-494.
178. Union Europea (UE). 2001. Reglamento (UE) N° 15/2011 de la comisión de 10 de enero de 2011. Por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 2074/2005 en lo relativo a los métodos de

análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. Diario Oficial de la Unión Europea. L 6/3.

179. Uriarte, I., Farias, A., Carlos, J. (2001). Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquac. Eng.* 25, 139-147.
180. Van Egmond, H., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G., Waldock, M. (1993). Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *Journal of natural toxins* 2: 41-82.
181. Vershinin, A., Moruchkow, A., Morton, S., Leighfield, T., Quilliam, M., Ramsdell, J. (2006). Phytoplankton composition of the Kandalaksha Gult Russian White Sea: Dinophysis and lipophilic toxins in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Harmful Algae* 5, 558-564.
182. Viviani, R. (1992). Eutrophication, marine biotoxinas, human health. *Sci. Total environ. Suppl.* Suppl.: 631-662.
183. Wilkins, A., Rehmann, N., Torgersen, T., Rundberget, T., Keogh, M., Petersen, D., Hess, P., Rise, F., Miles, C. (2006). Identification

of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54:5672-5678.

184. Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 44: 1249-1255.
185. Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46: 1405-1411.
186. Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J., Torigoe, K. (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. Elsevier., Amsterdam., pp. 375-382.
187. Yasumoto, T., Murata, M. (1993). Marine Toxins. *Chem. Rev.* 93:1897-1909.
188. Yasumoto, T. y Takizawa, A. (1997). Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61: 1775-7.
189. Yasumoto. T., Igarashi, T., Satake, M. (2001). Chemistry of phycotoxins-structural elucidation. *En: Ponsen & Looyen de keo*,

W.J., Samson, R., Van Egmond, P., Gilbert, J., Sabino, M. [Eds.].  
*Proceedings of the X International IUPAC Symposium on  
Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of*

190. *The Millennium*. Wageningen, the Netherlands, Guarujá, Brazil, pp.  
465-474.

## **IX. ANEXOS**

### Anexo 1. Muestras homogenizadas



### Anexo 2. Pesado de muestras y codificación



### Anexo 3. Ultraturrax



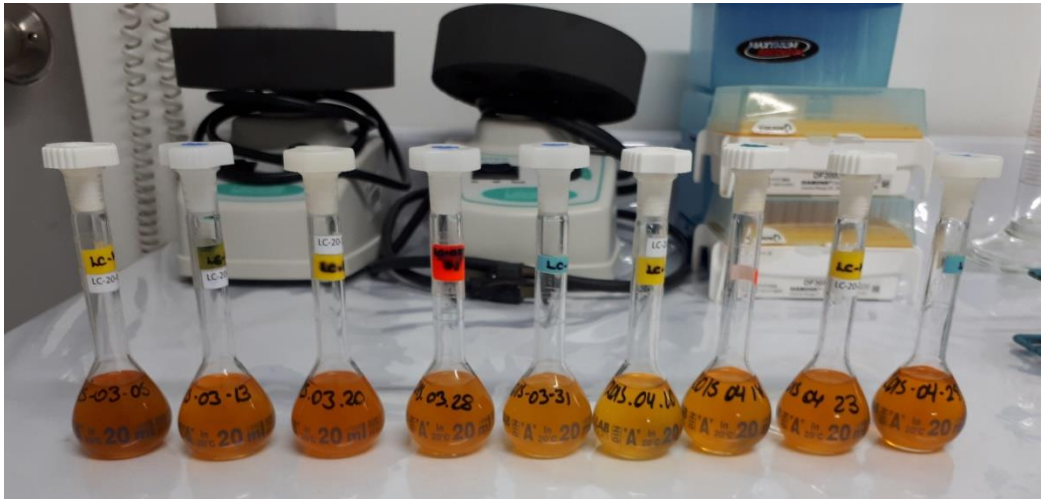
#### Anexo 4. Solventes grado LC MS



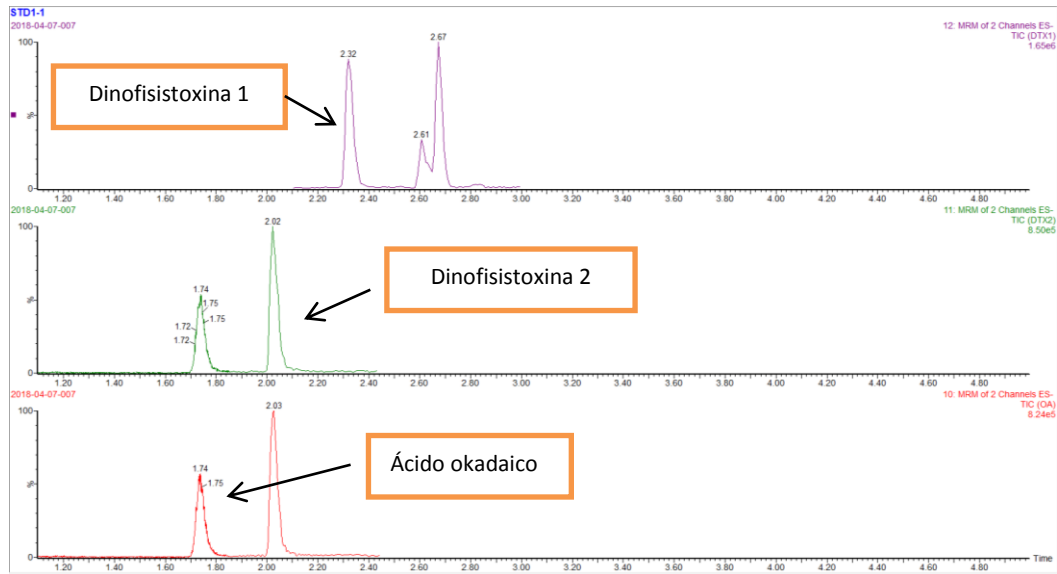
#### Anexo 5. Proceso de extracción



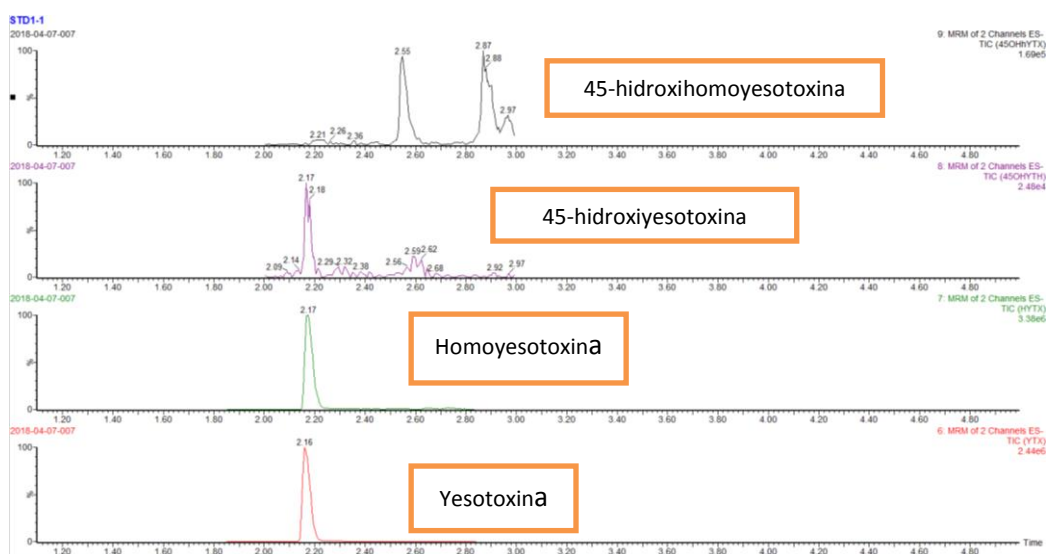
## Anexo 6. Extracto de las muestras



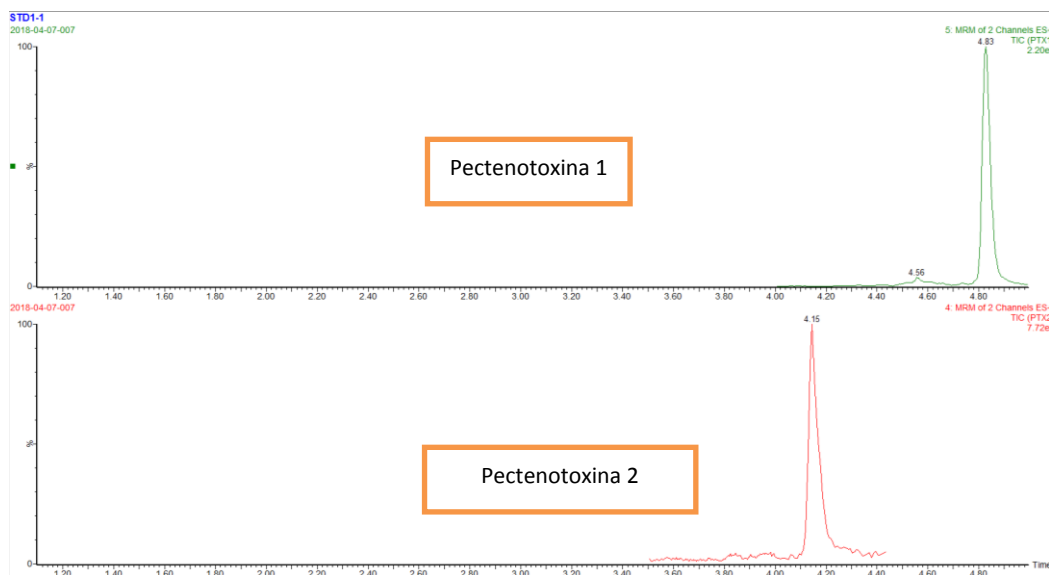
## Anexo 7. Cromatograma del Estándar 1 del grupo Acido Okadaico



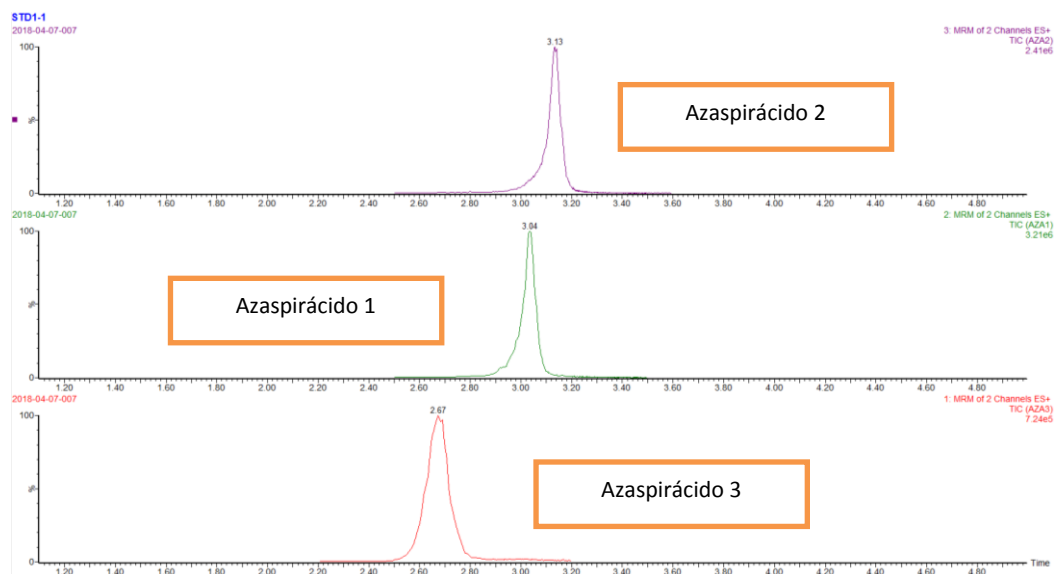
**Anexo 8. Cromatograma del Estándar 1 del grupo de las Yesotoxinas.**



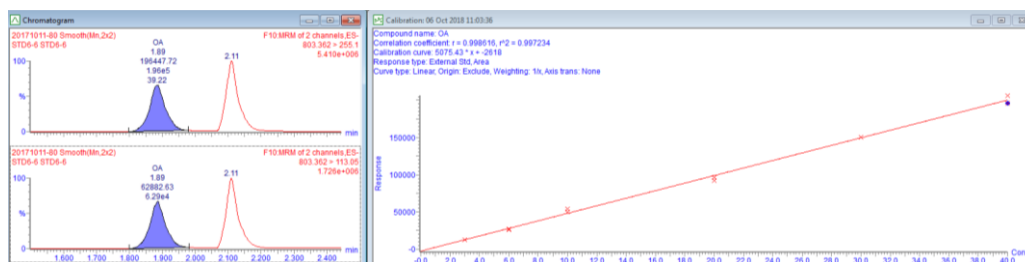
**Anexo 9. Cromatograma del Estándar 1 del grupo de las Pectenotoxinas.**



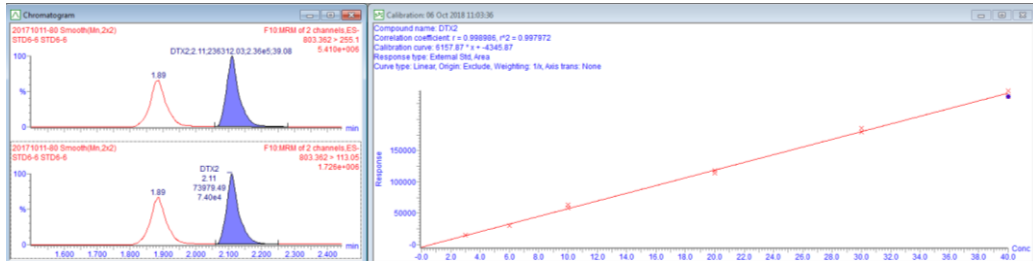
### Anexo 10. Cromatograma del Estándar 1 del grupo de los Azaspirácidos.



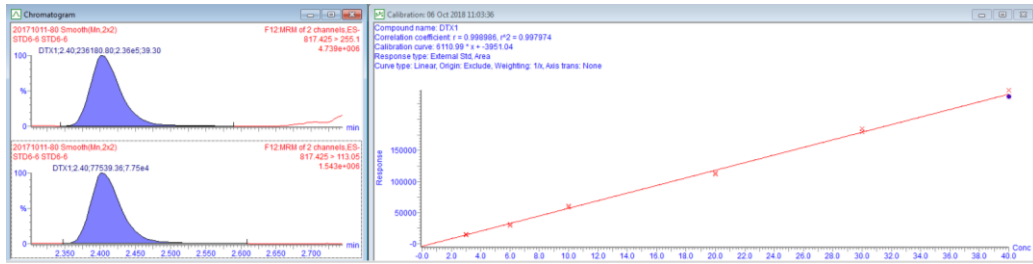
### Anexo 11. Linealidad de Acido okadaico



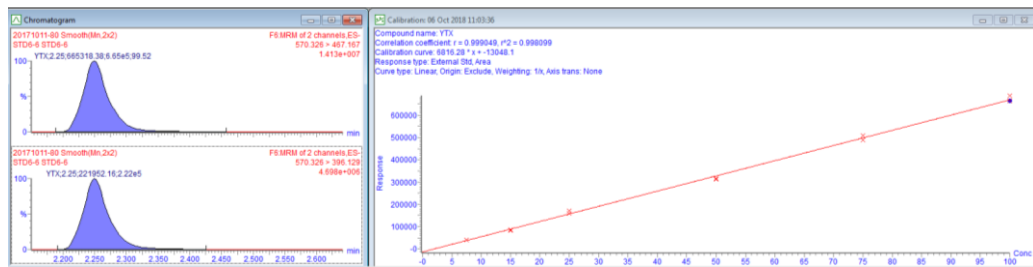
### Anexo 12. Linealidad de la Dinofisistoxina 2



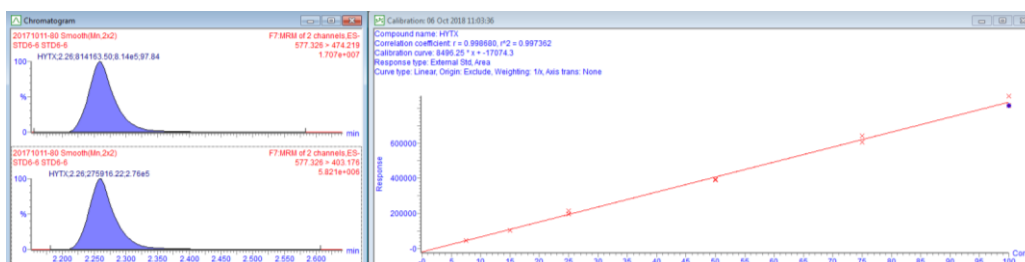
### Anexo 13. Linealidad de la Dinofisistoxina 1



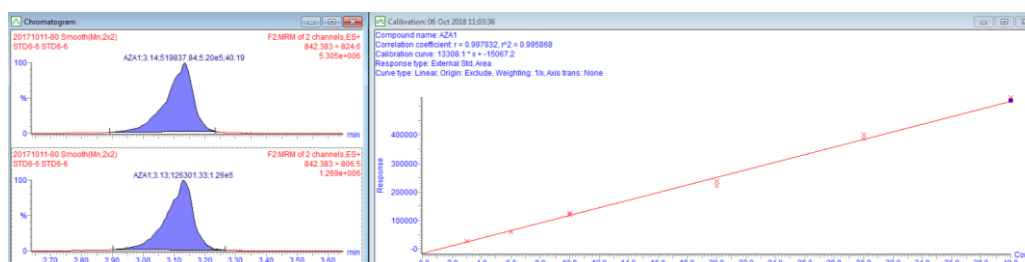
### Anexo 14. Linealidad de la Yesotoxina y 45-hidroxiyesotoxina



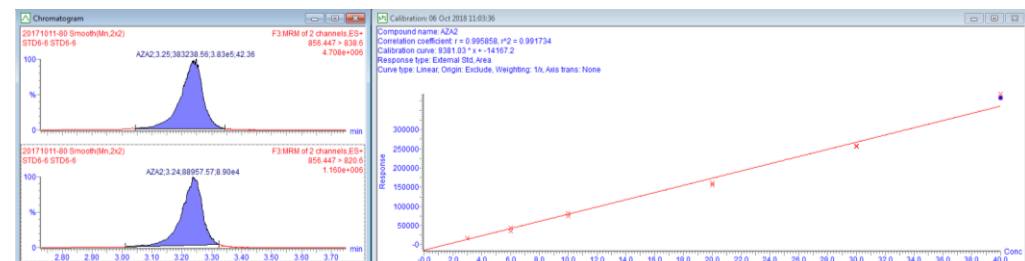
### Anexo 15. Linealidad de la Homoyesotoxina y 45-hidroxihomoyesotoxina



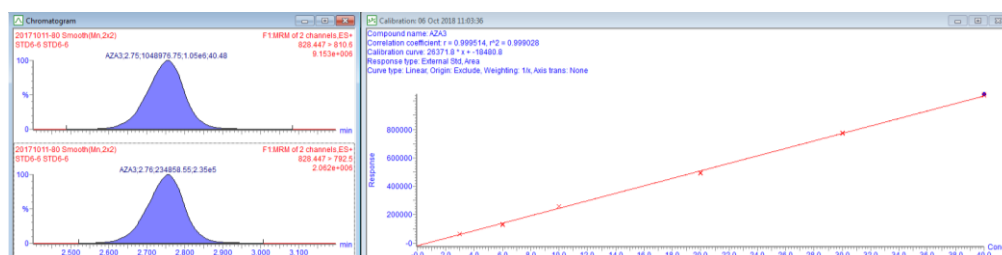
### Anexo 16. Linealidad del Azaspirácido 1



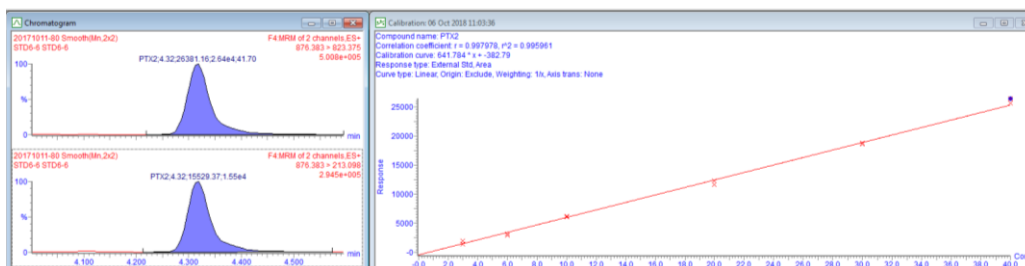
### Anexo 17. Linealidad del Azaspirácido 2



### Anexo 18. Linealidad del Azaspirácido 3

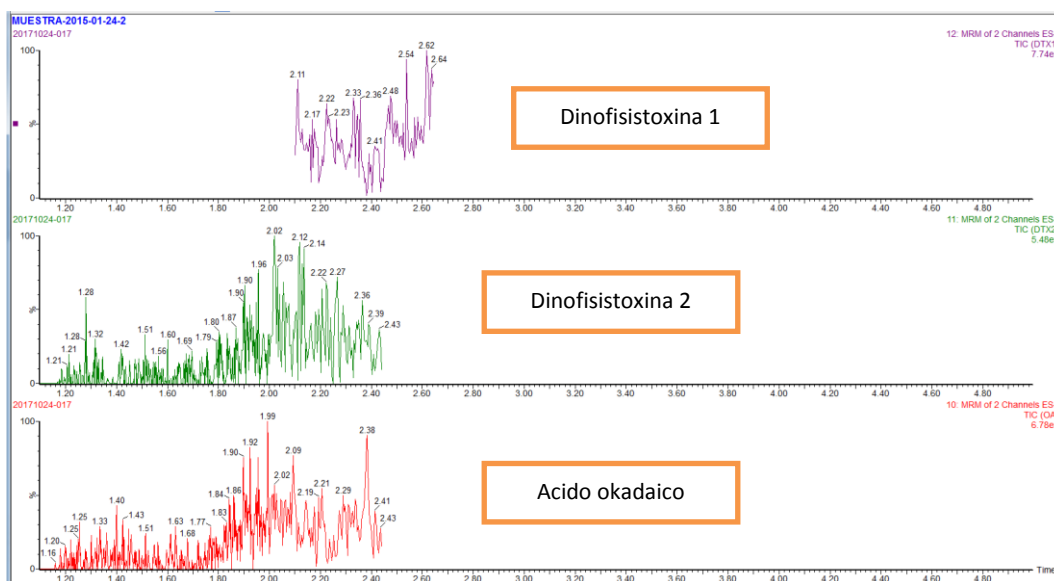


### Anexo 19. Linealidad de la Pectenotoxina 2 y 1

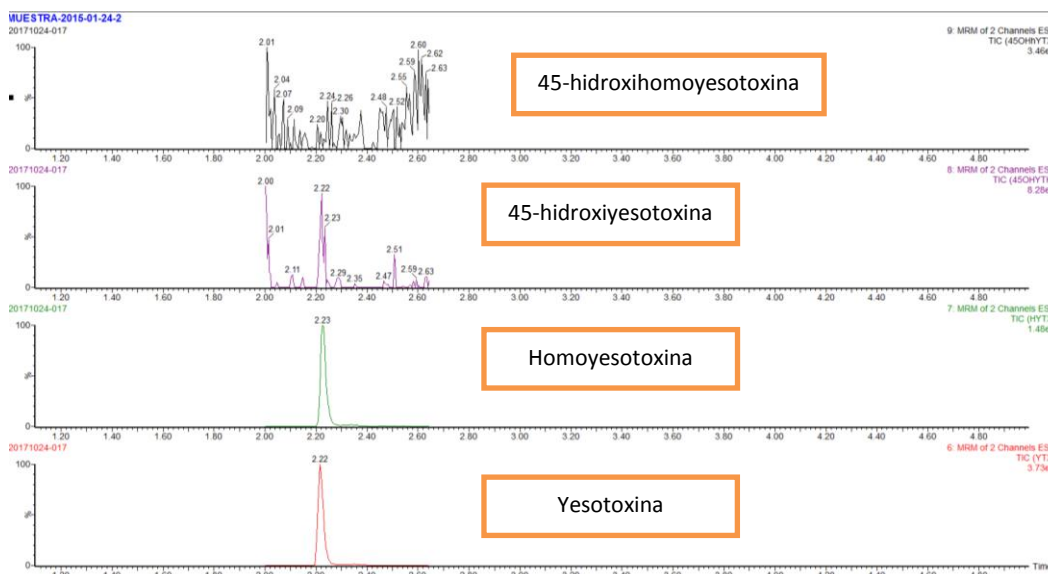


## Anexo 20. Cromatogramas de la muestra 2015-01-24

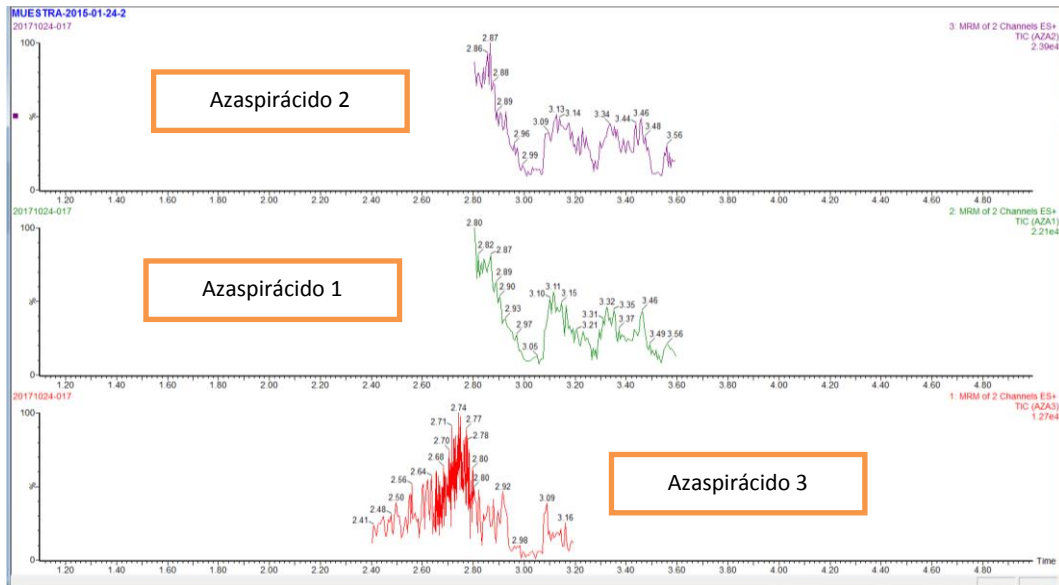
### A: Grupo del Ácido Okadaico



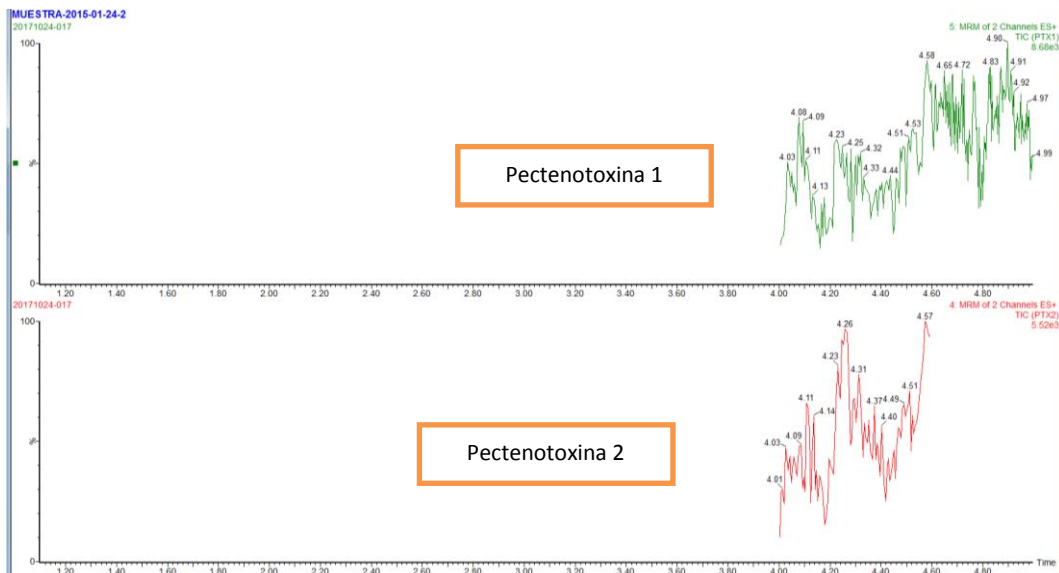
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

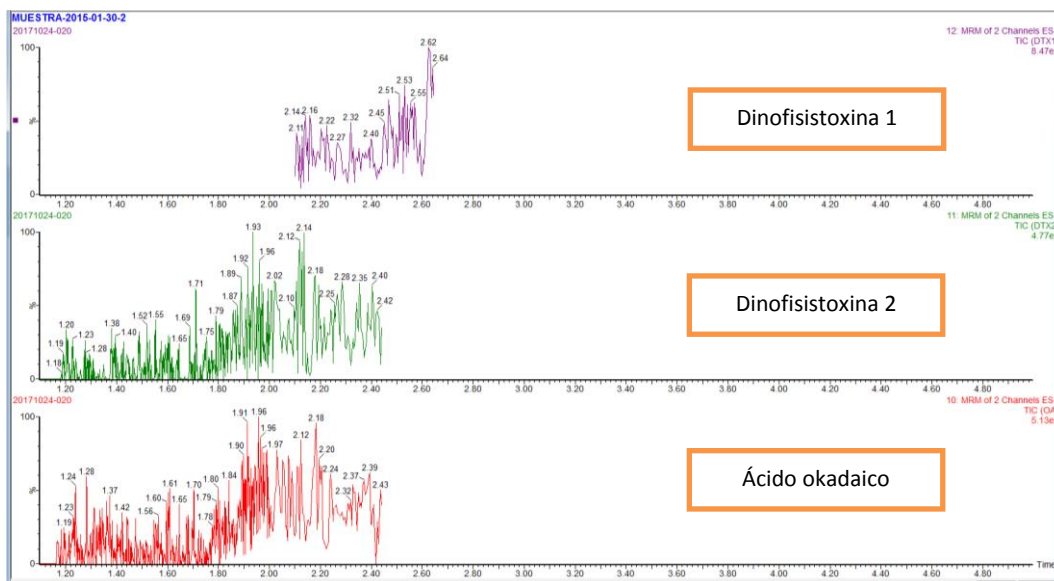


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

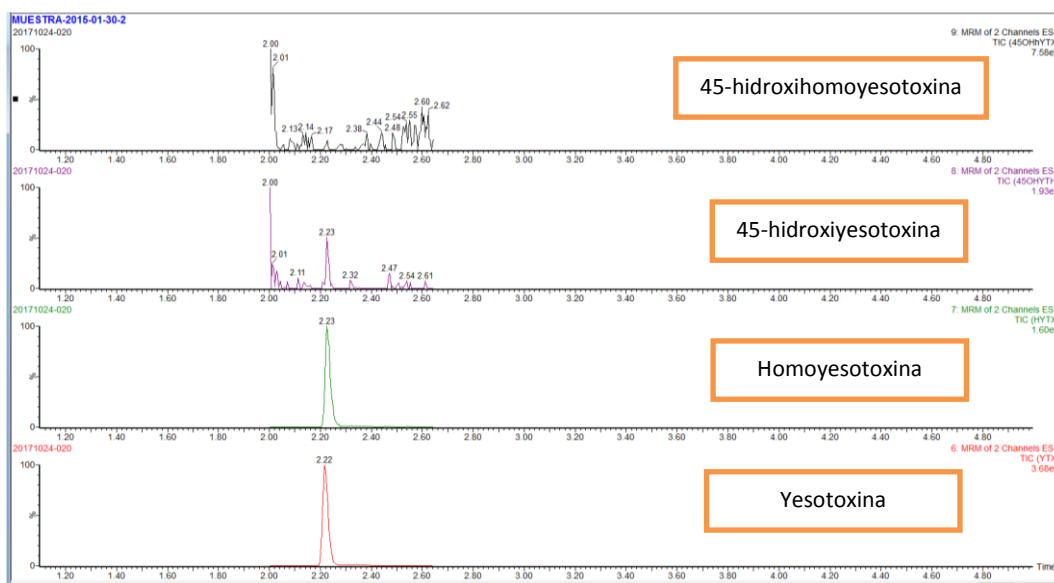


## Anexo 21. Cromatogramas de la muestra 2015-01-30

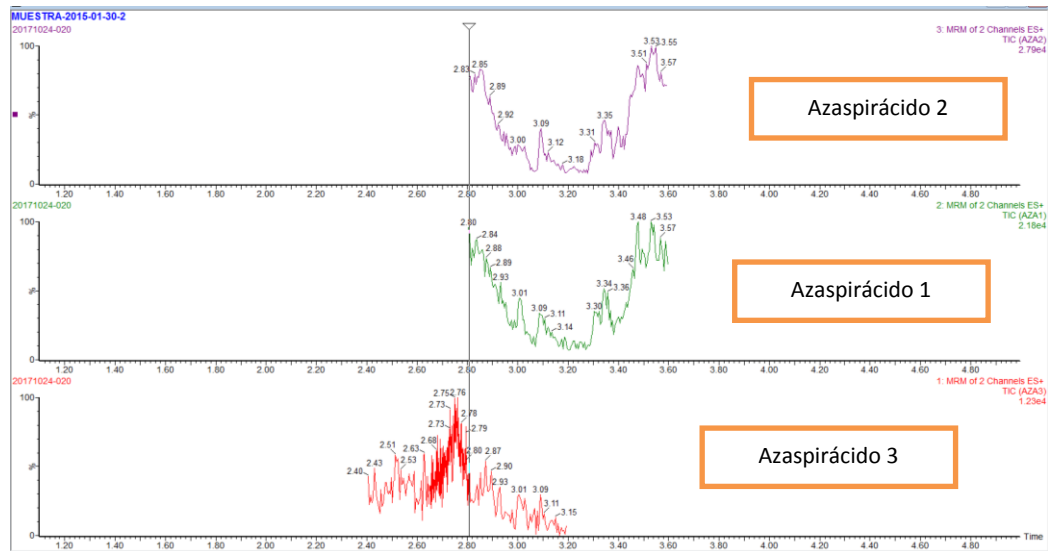
### A: Grupo del Ácido Okadaico



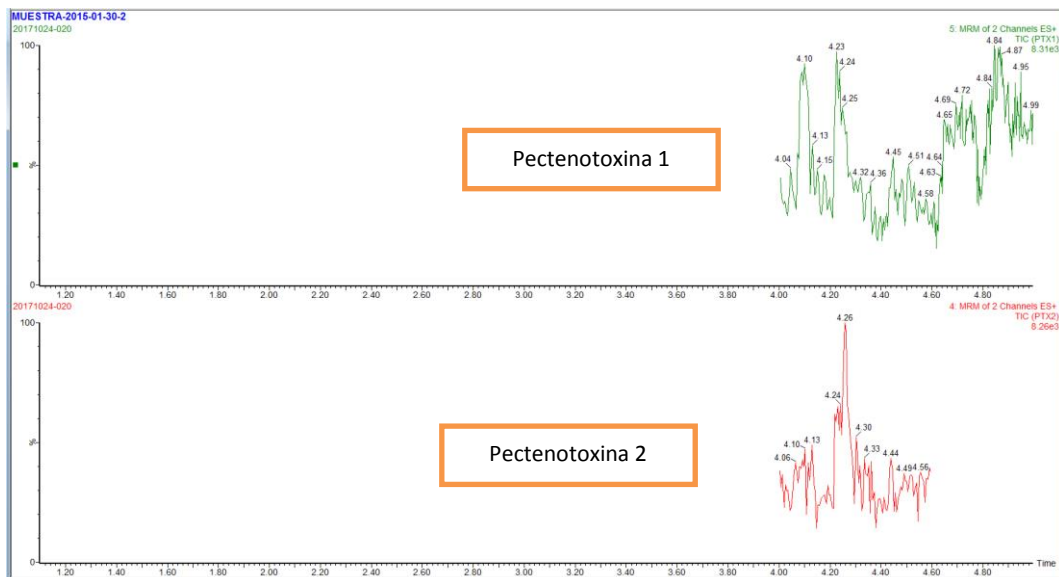
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

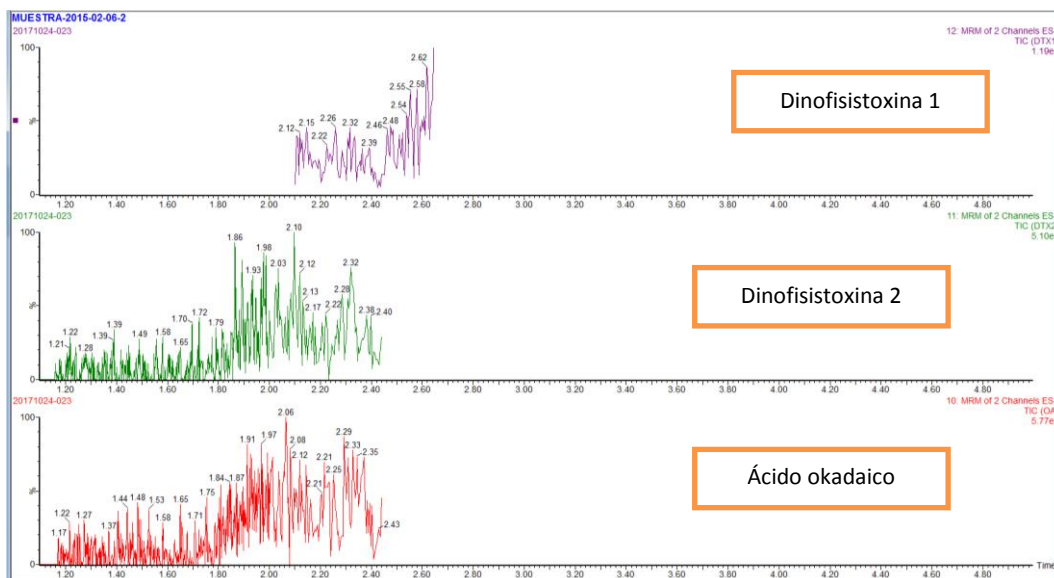


### D: Grupo de las pectenotoxinas

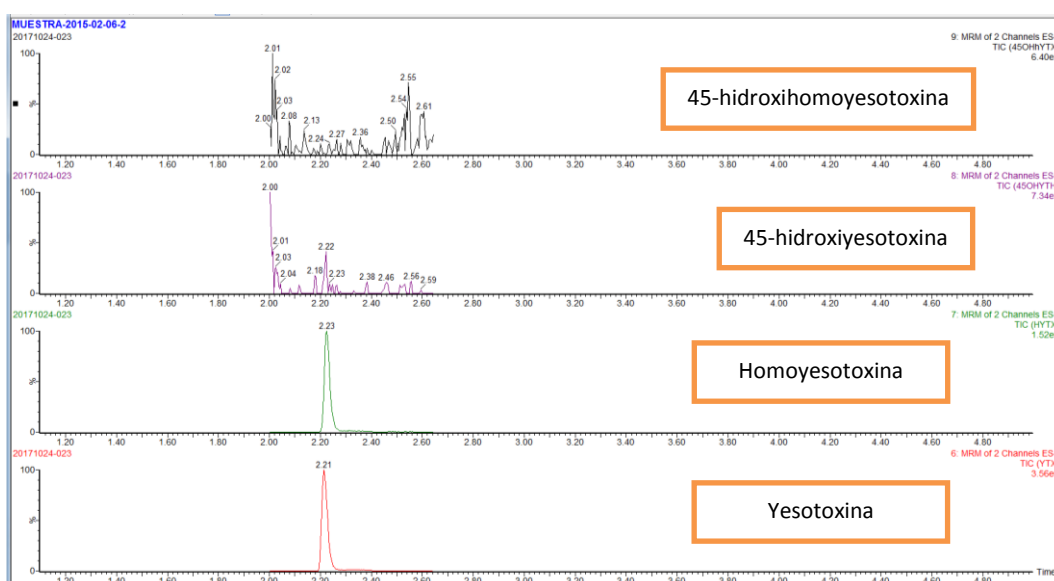


## Anexo 22. Cromatogramas de la muestra 2015-02-06

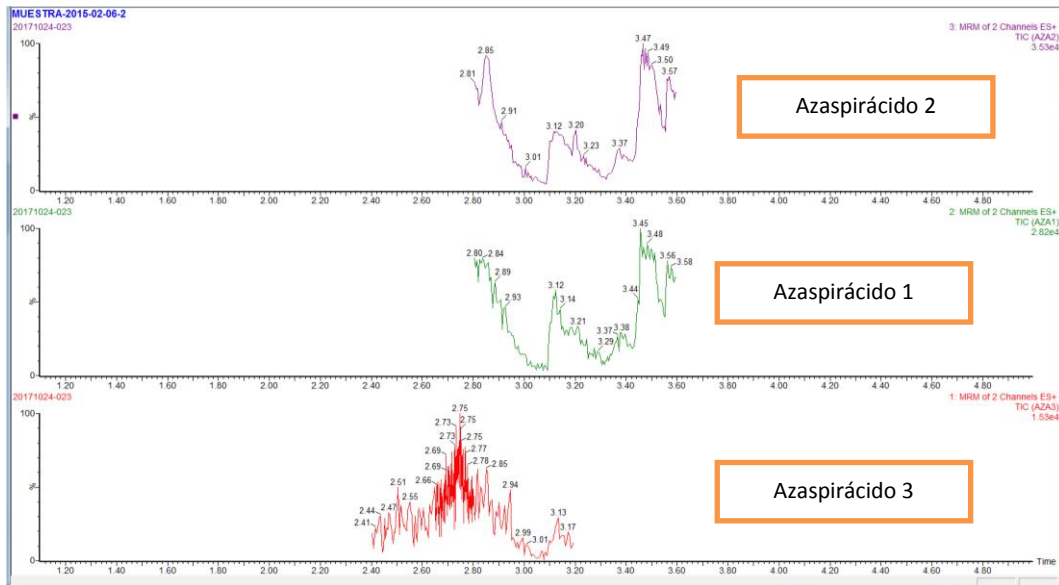
### A: Grupo del Ácido Okadaico



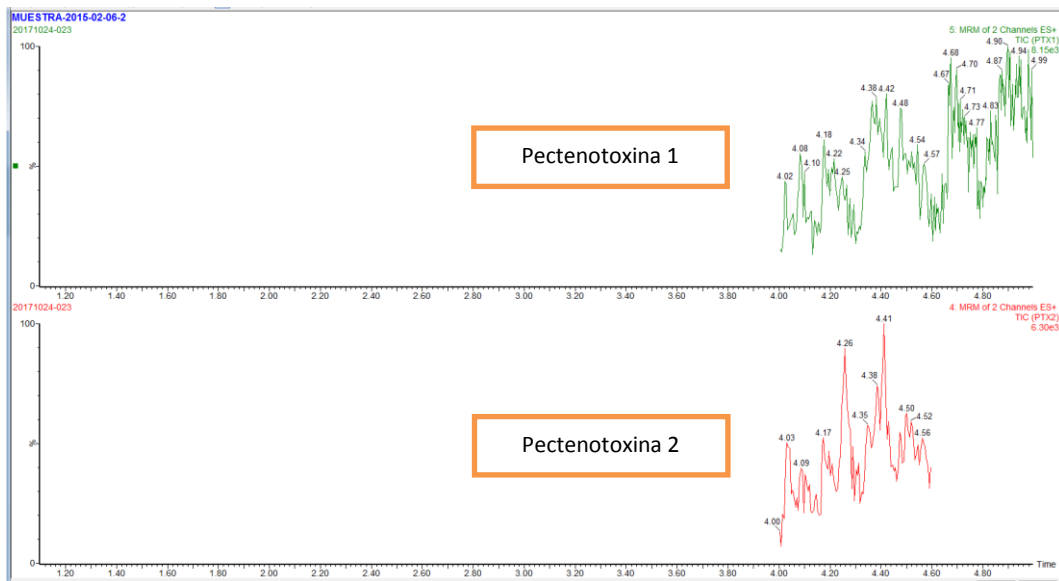
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

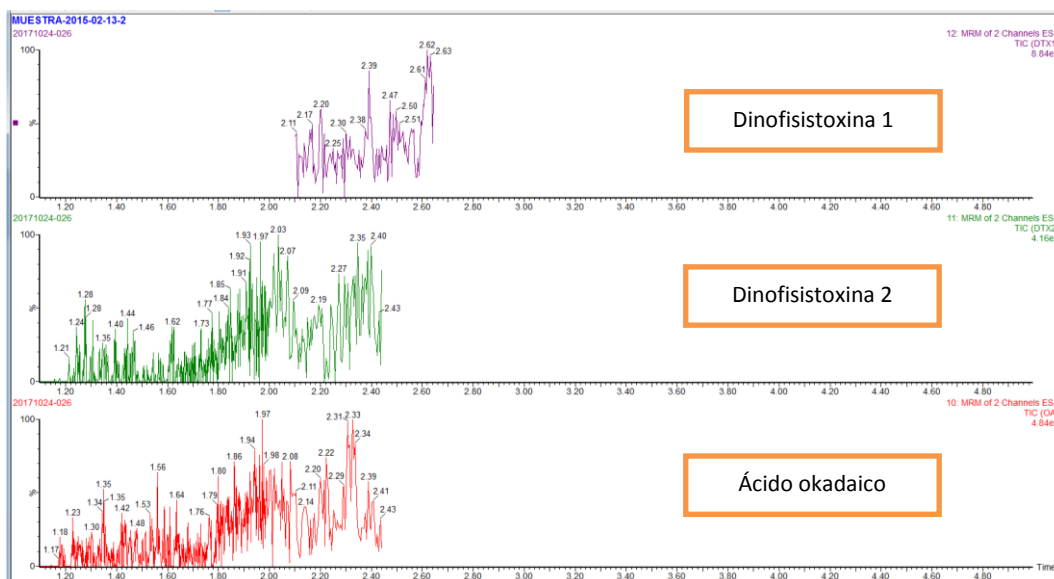


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

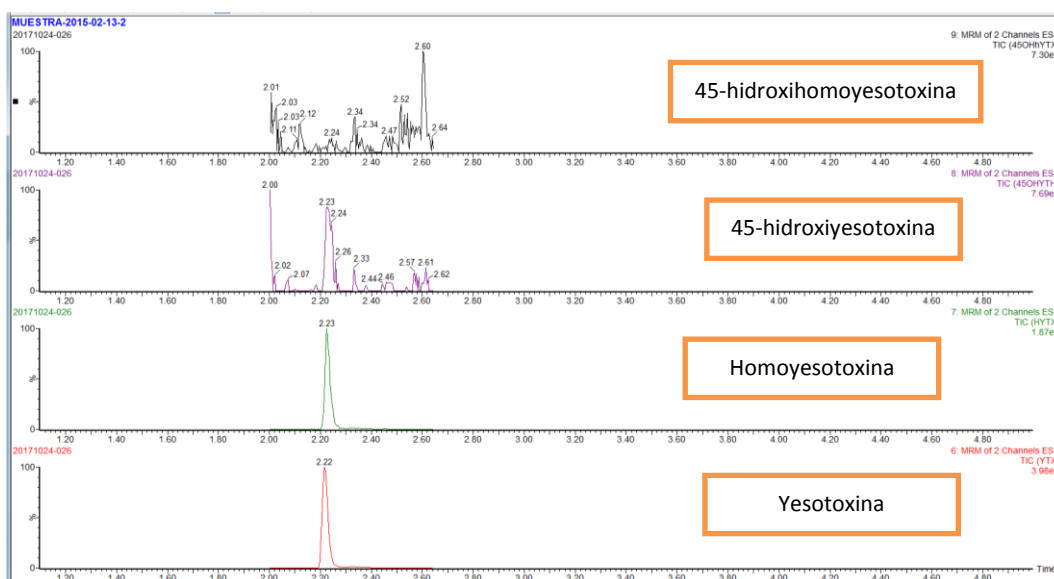


## Anexo 23. Cromatogramas muestra 2015-02-13

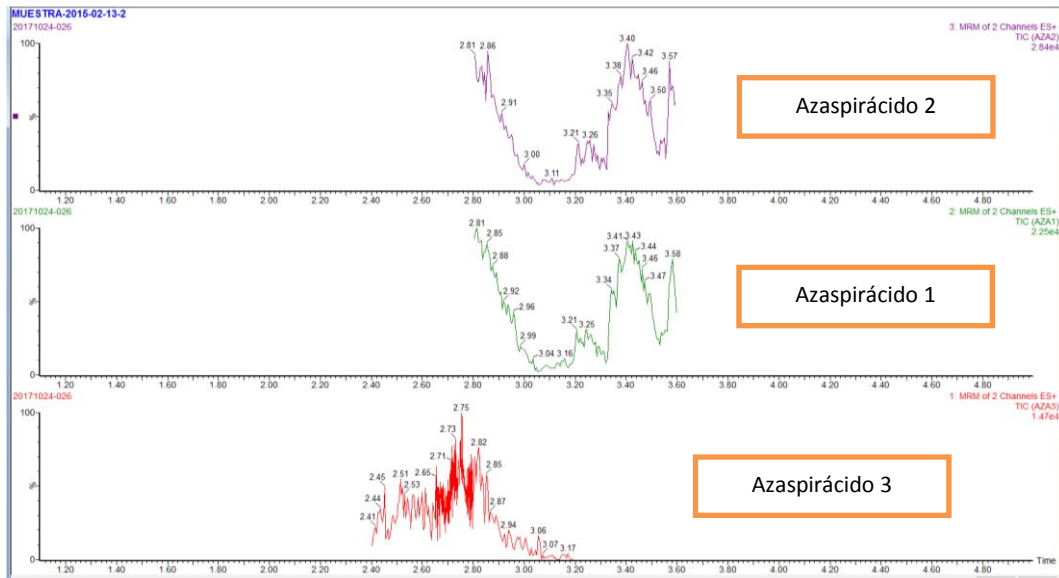
### A: Grupo del Ácido Okadaico



### B: Grupo de las Yesotoxinas

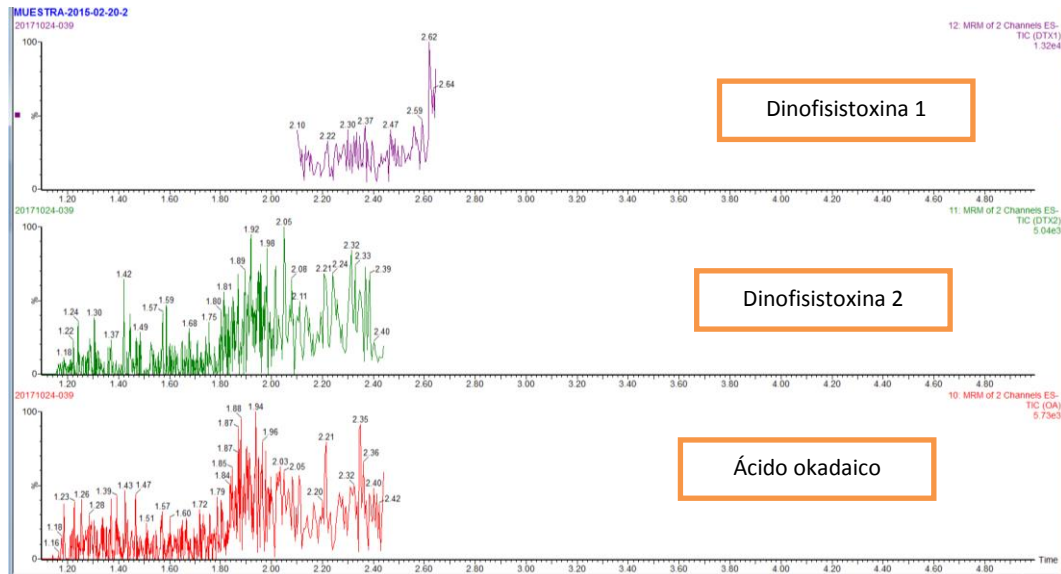


### C: Grupo de los Azaspirácidos

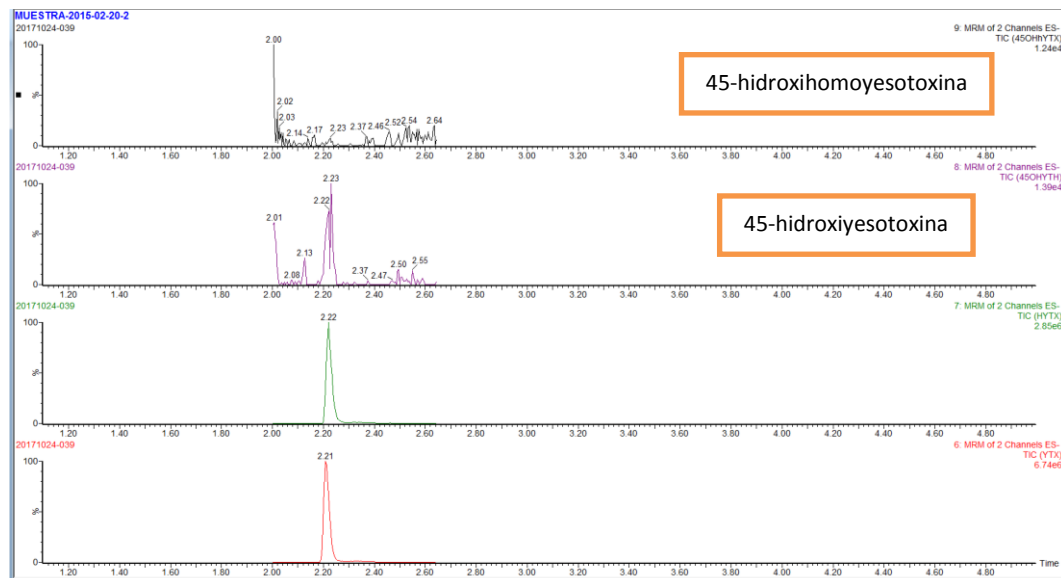


## Anexo 24. Cromatogramas muestra 2015-02-20

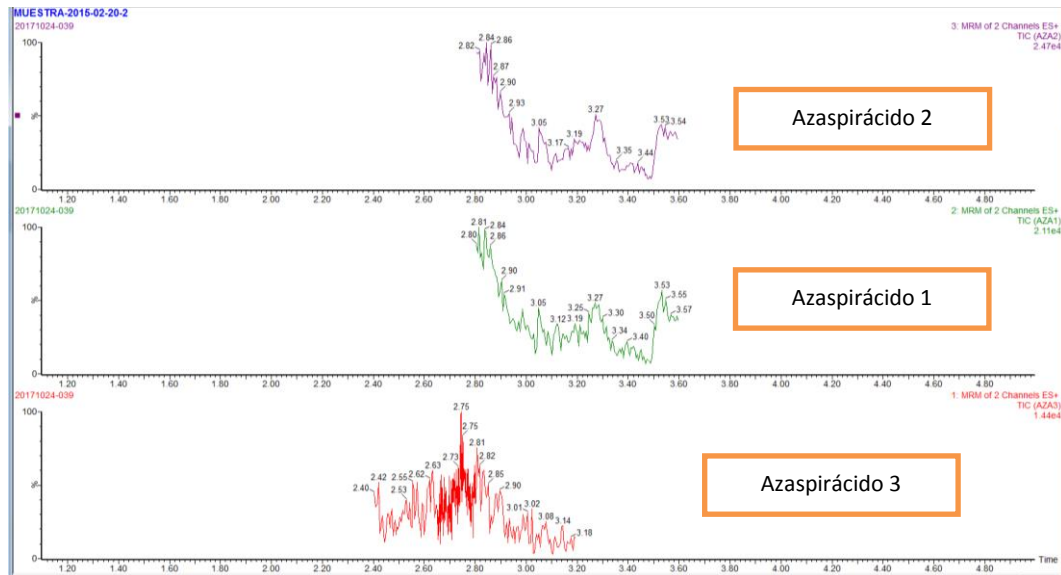
### A: Grupo del Ácido Okadaico



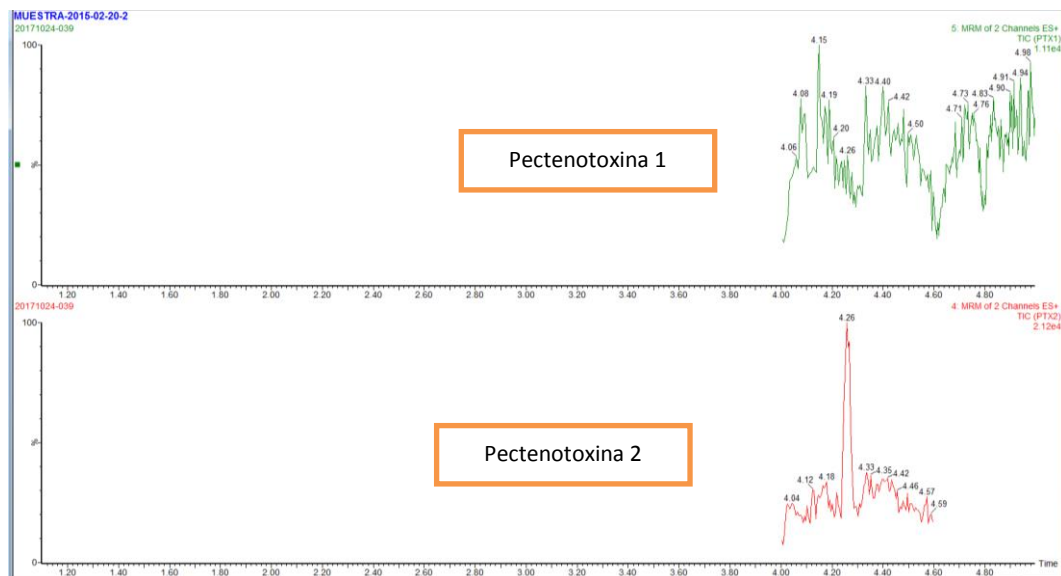
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

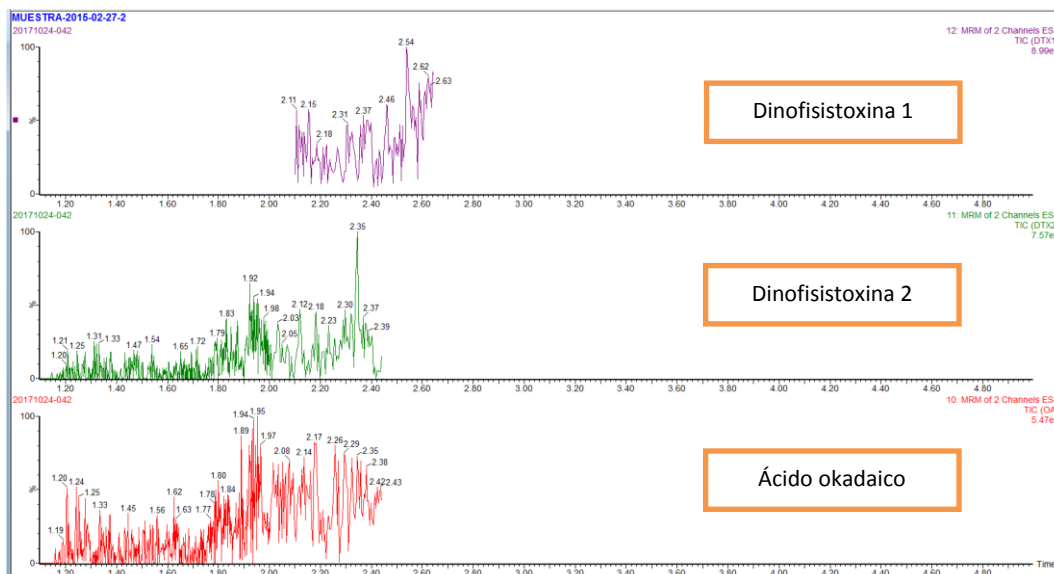


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

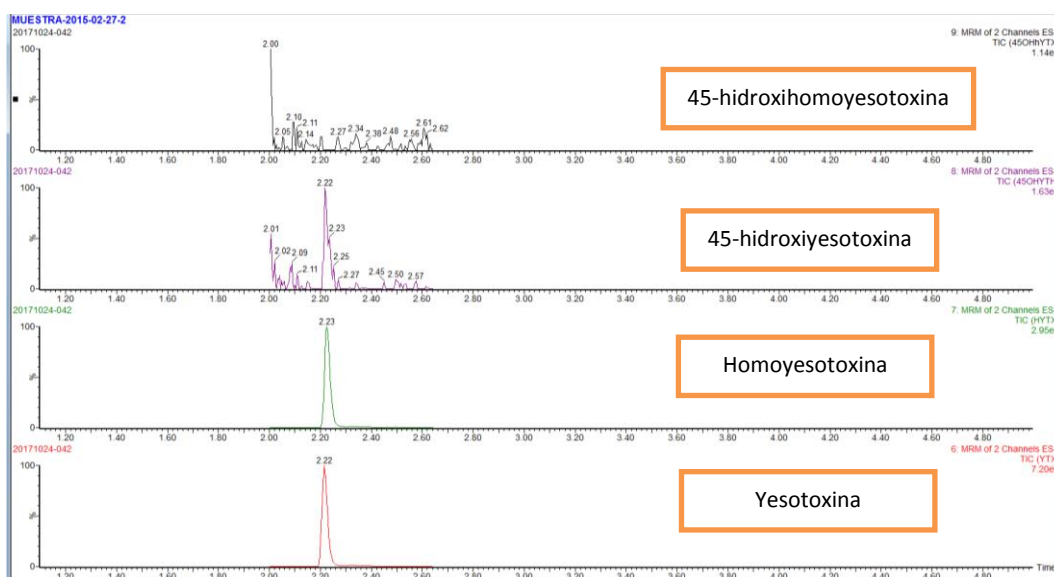


## Anexo 25. Cromatogramas muestra 2015-02-27

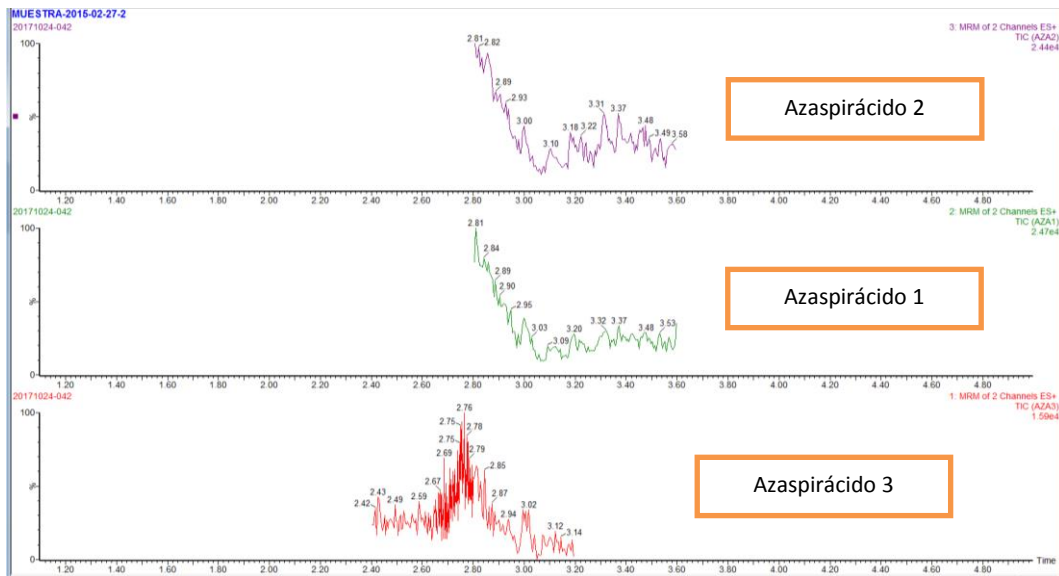
### A: Grupo del Ácido Okadaico



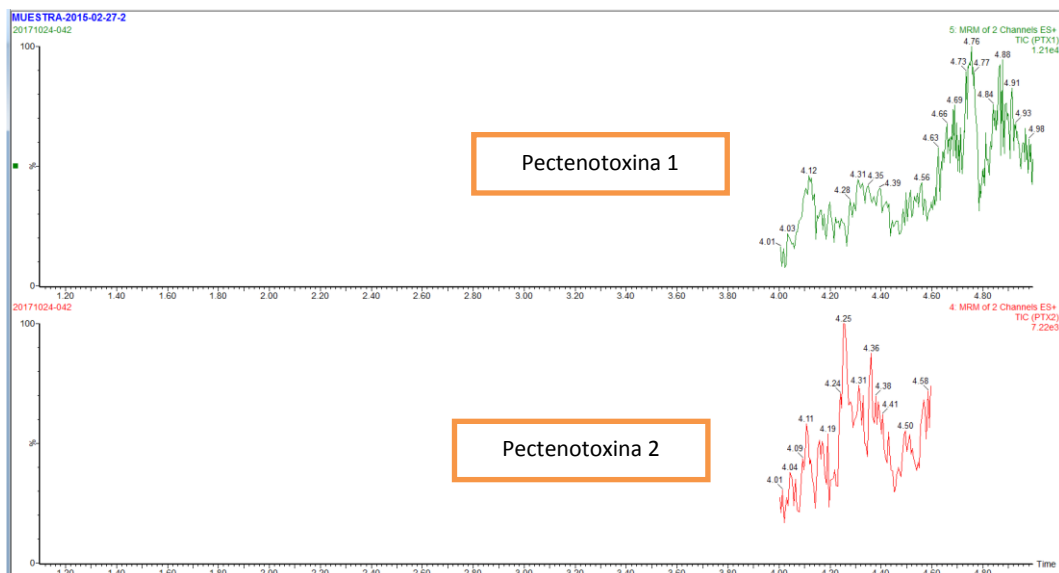
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

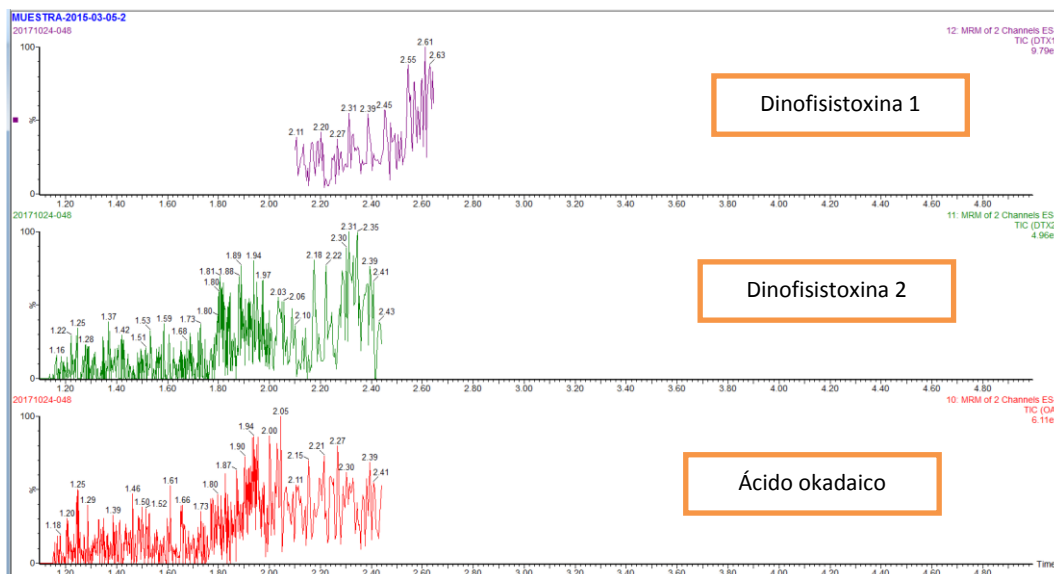


### D: Grupo de las Pectenotoxinas



## Anexo 26. Cromatogramas muestra 2015-03-05

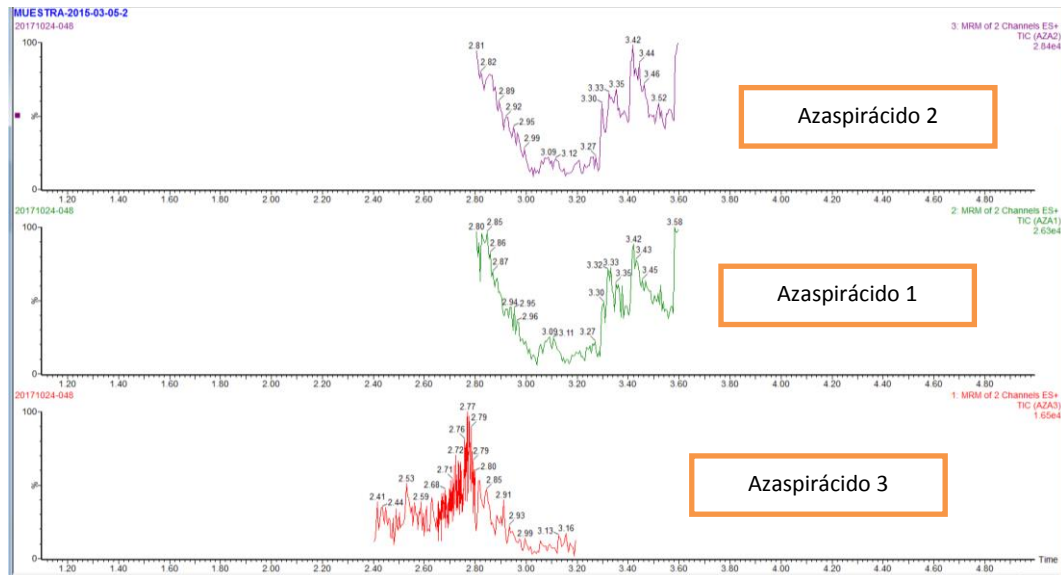
### A: Grupo del Ácido Okadaico



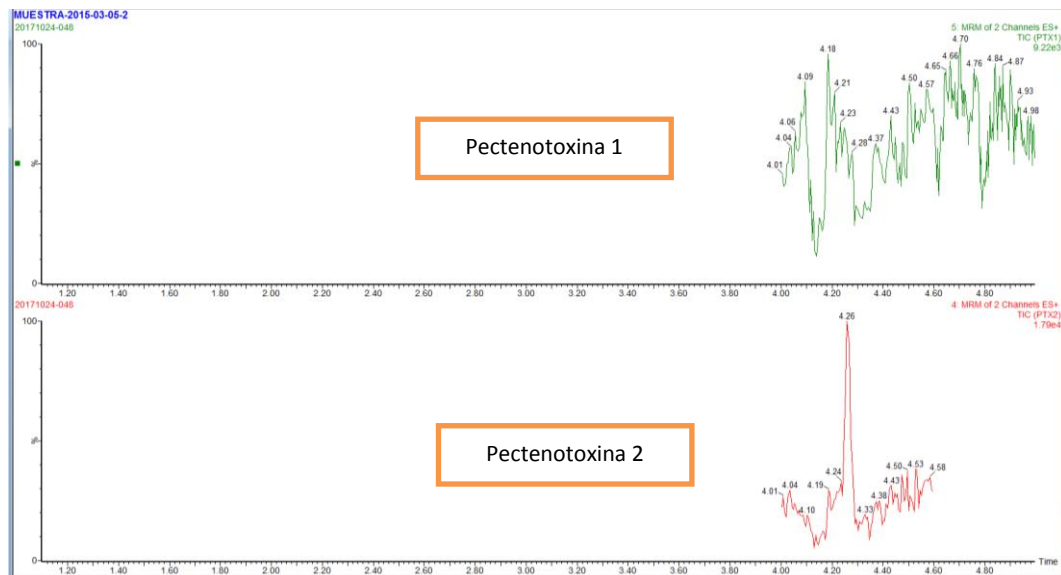
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

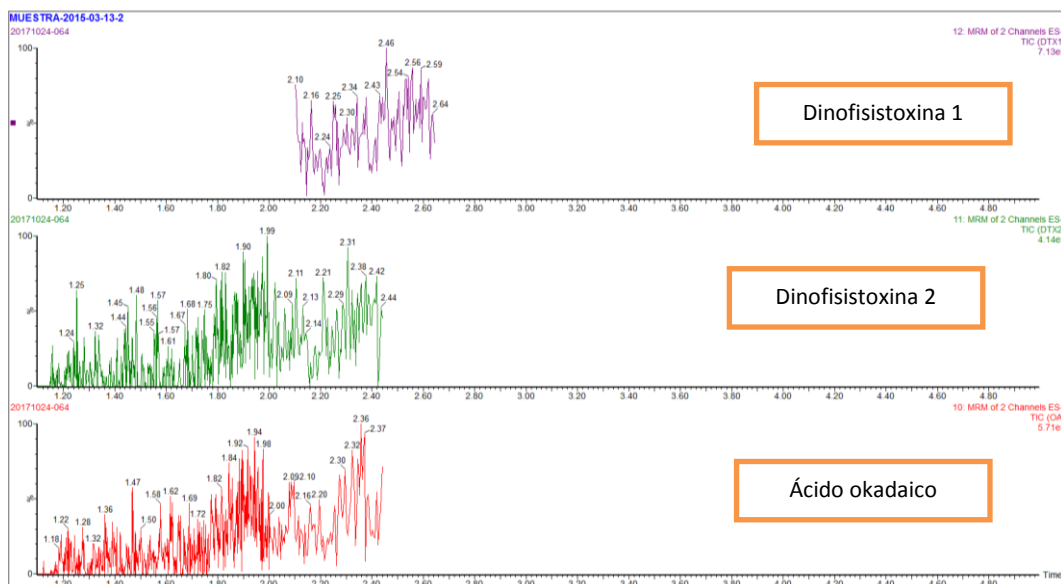


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

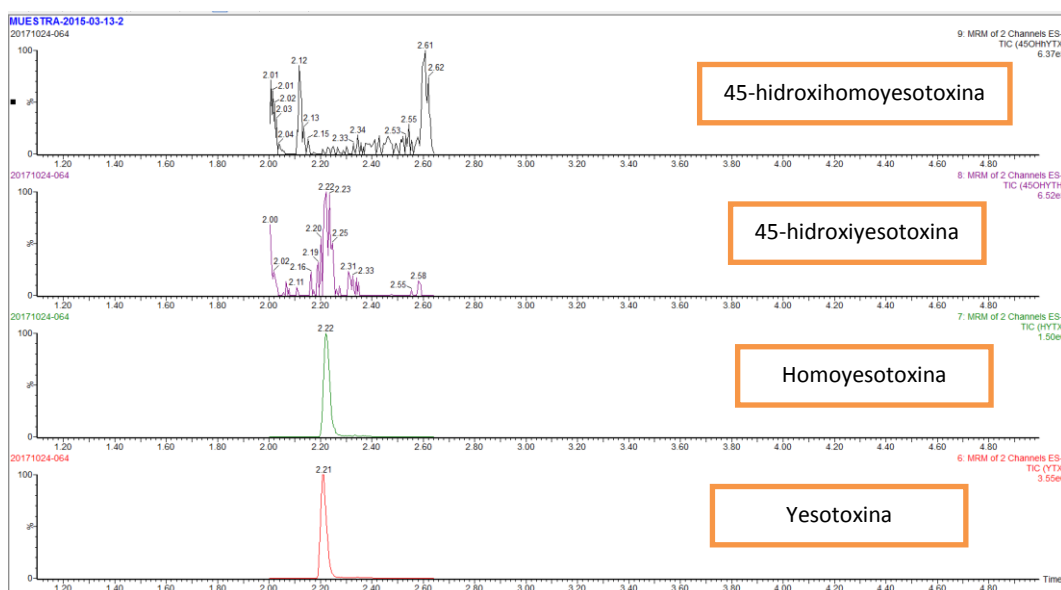


## Anexo 27. Cromatogramas muestra 2015-03-13

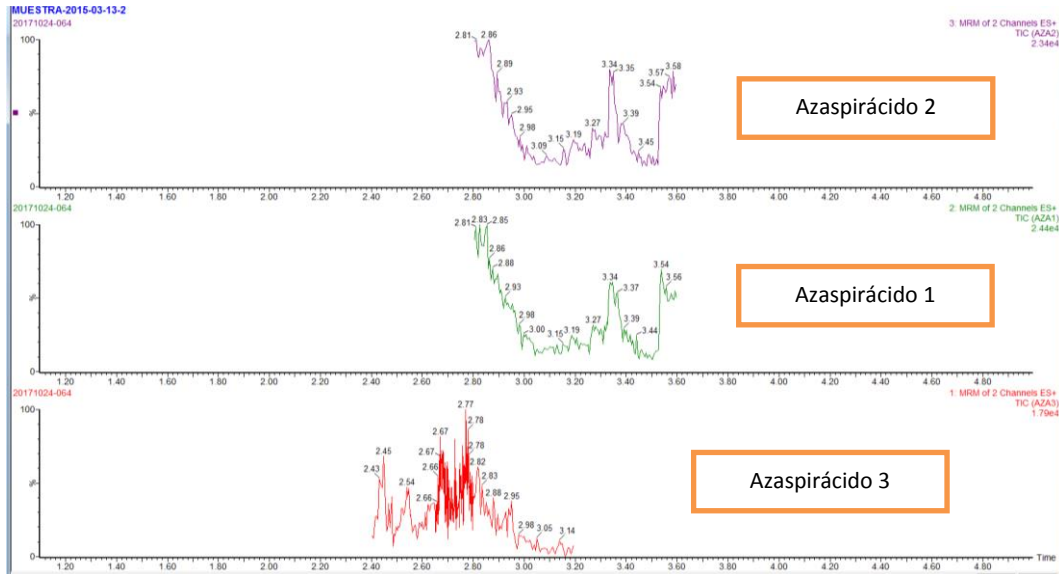
### A: Grupo del Ácido Okadaico



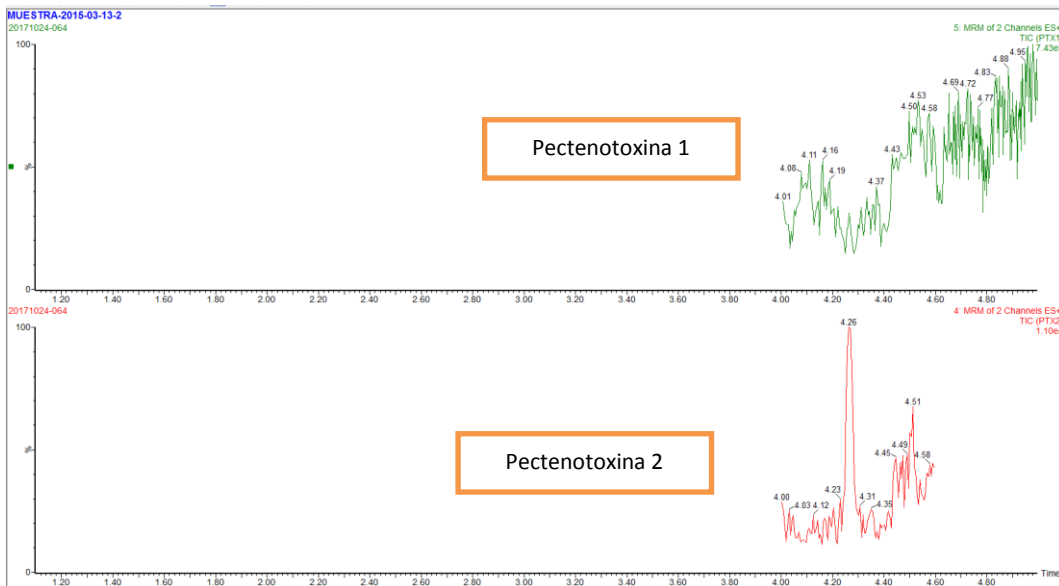
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

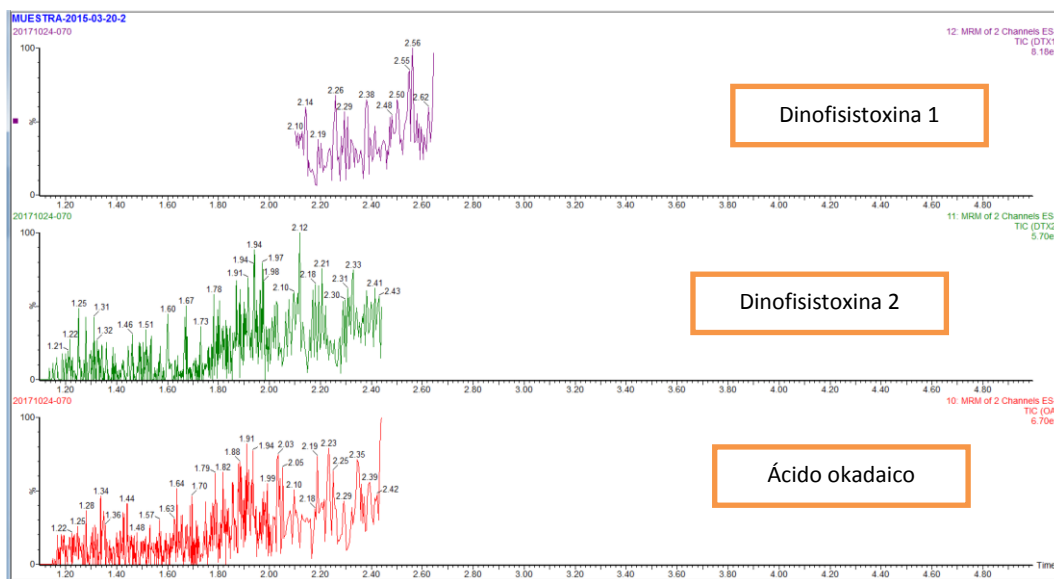


### D: Grupo de las Pectenotoxinas



## Anexo 28. Cromatogramas muestra 2015-03-20

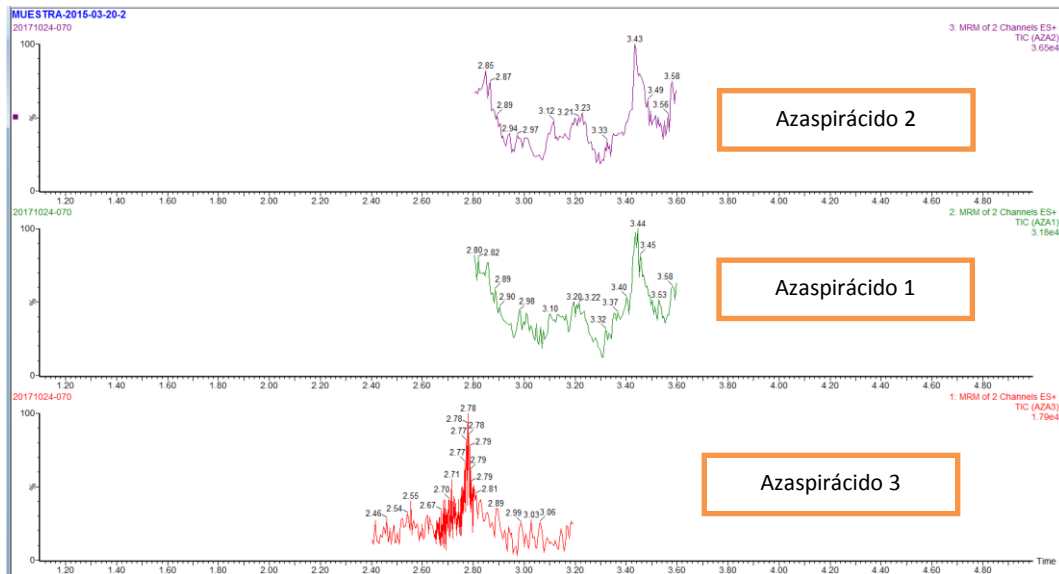
### A: Grupo del Ácido Okadaico



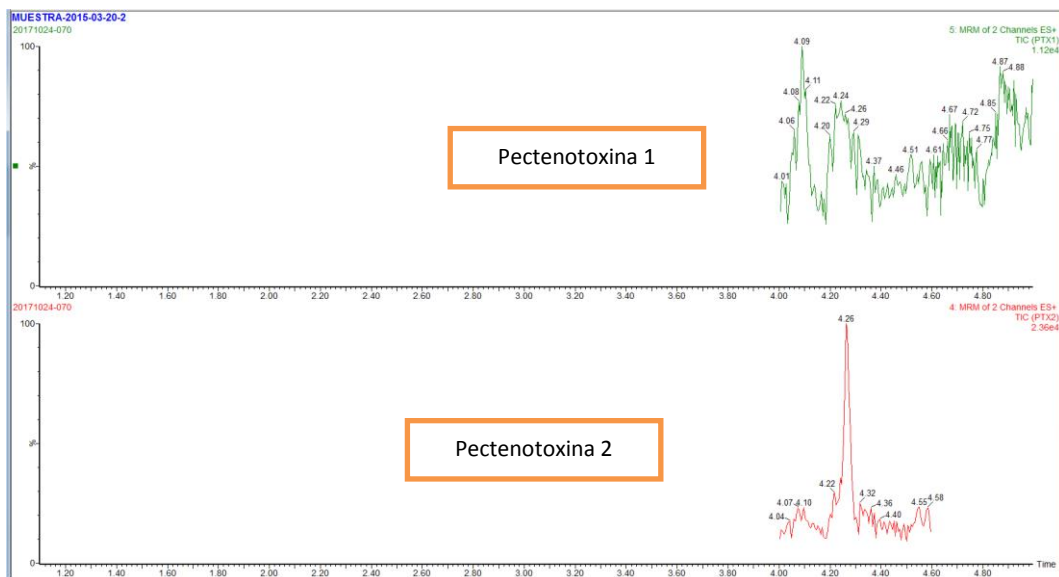
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

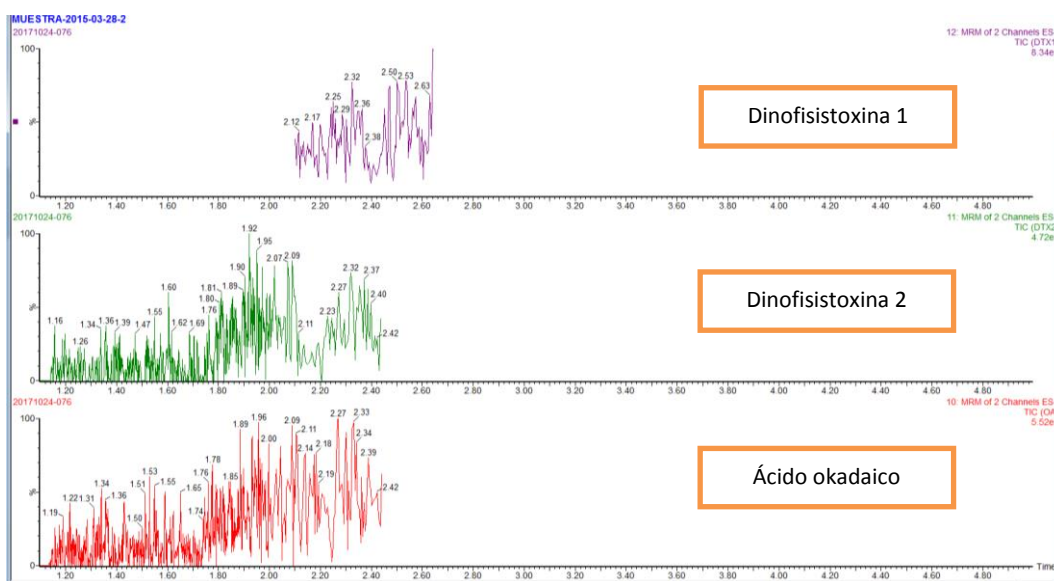


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

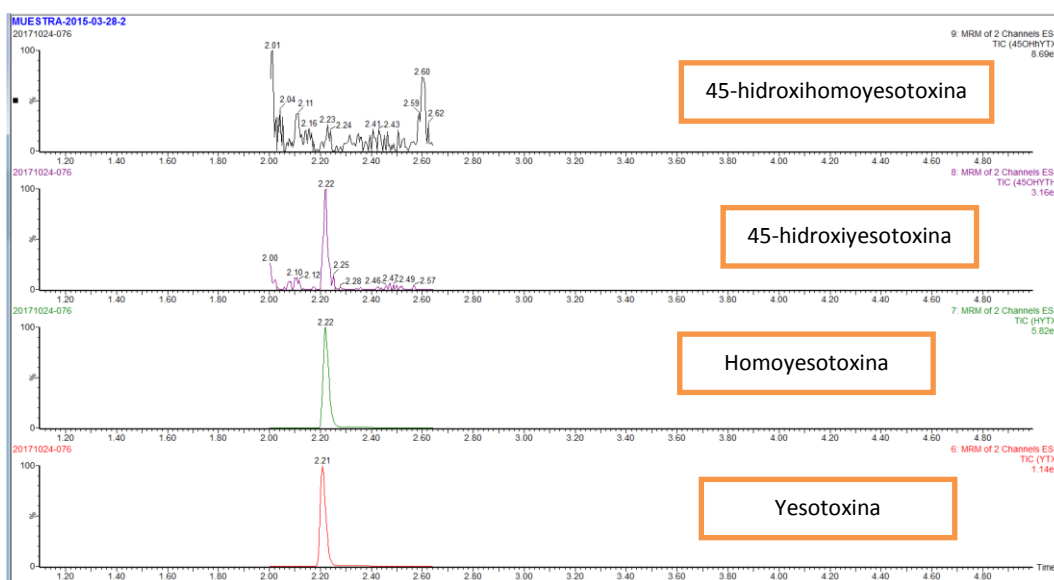


## Anexo 29. Cromatogramas muestra 2015-03-28

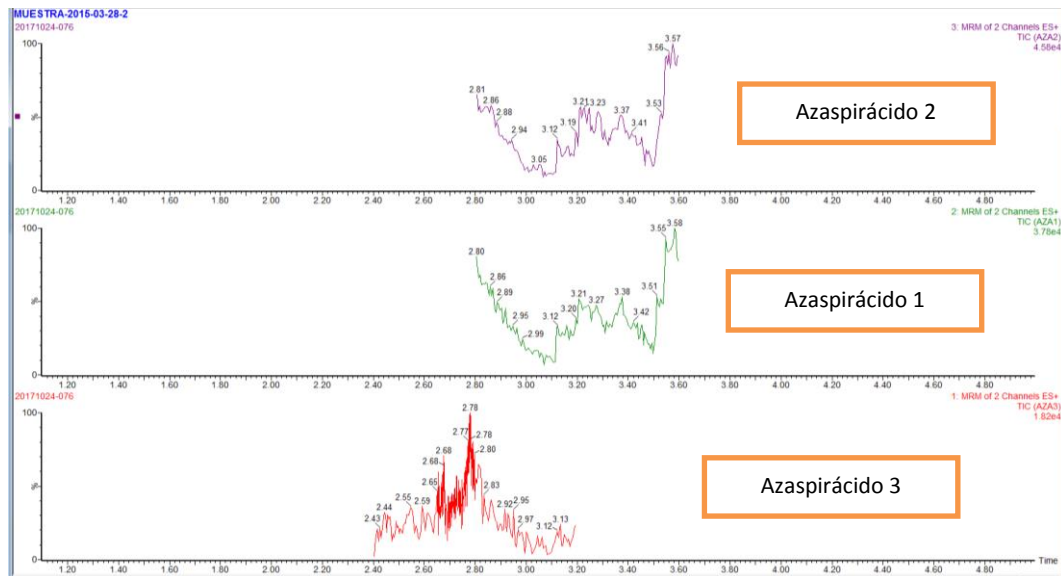
### A: Grupo del Ácido Okadaico



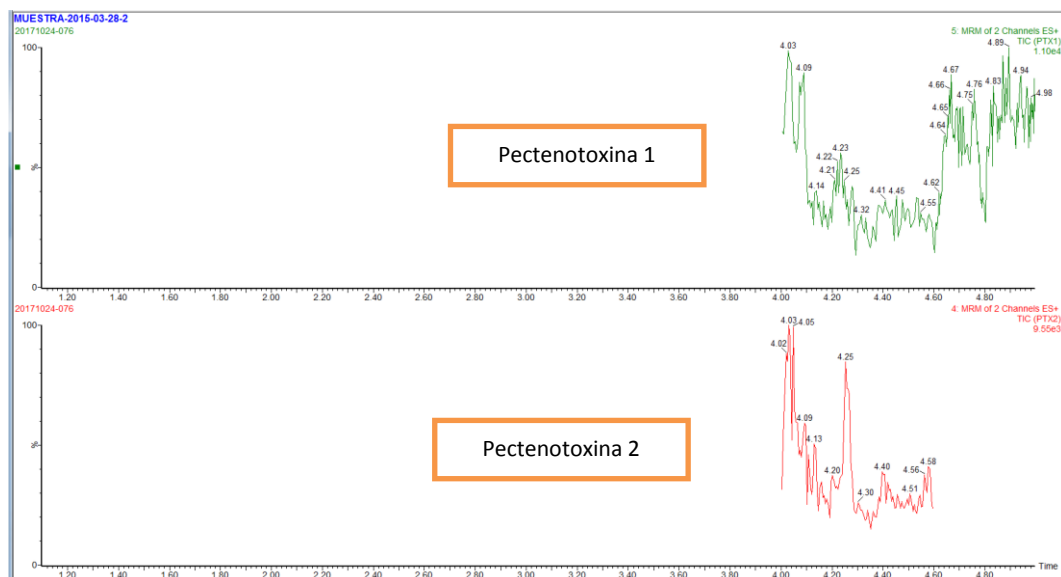
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

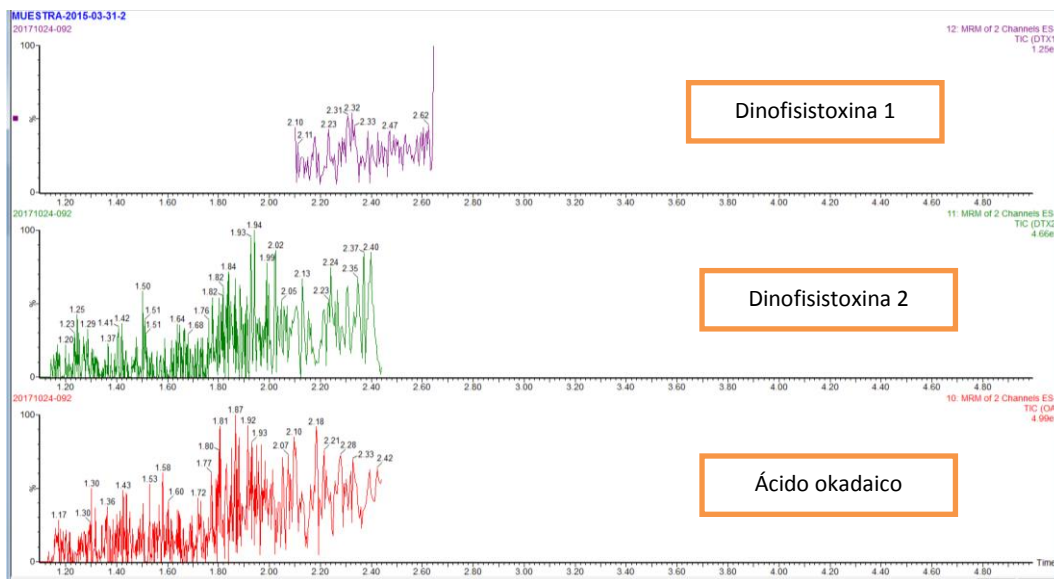


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

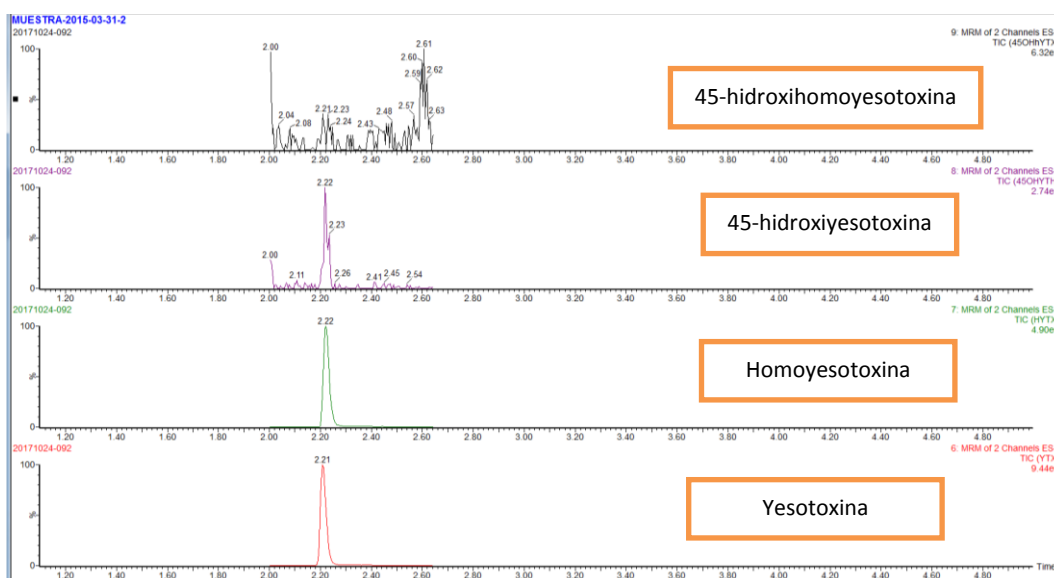


### Anexo 30. Cromatogramas muestra 2015-03-31

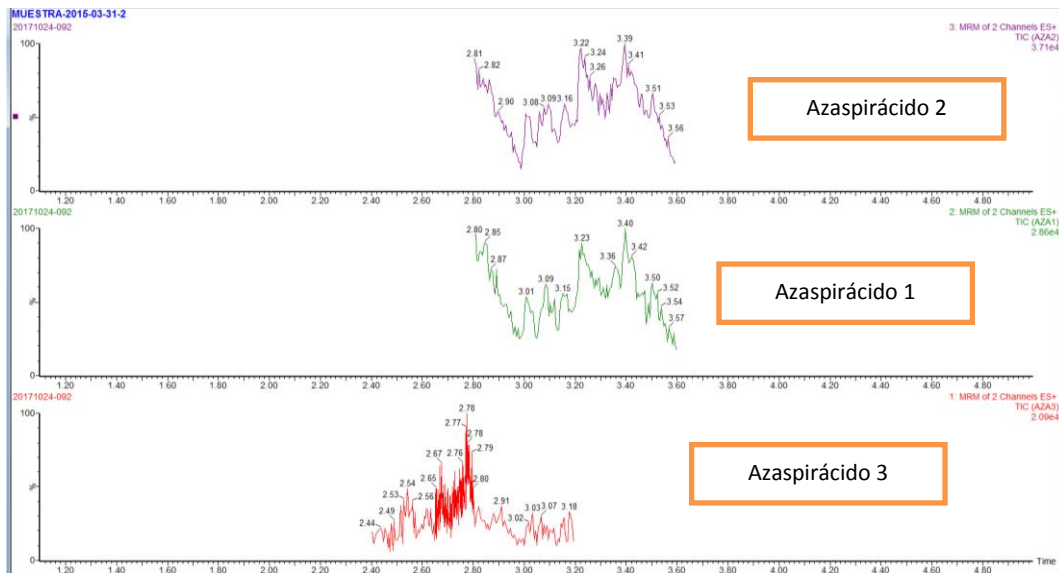
#### A: Grupo del Ácido Okadaico



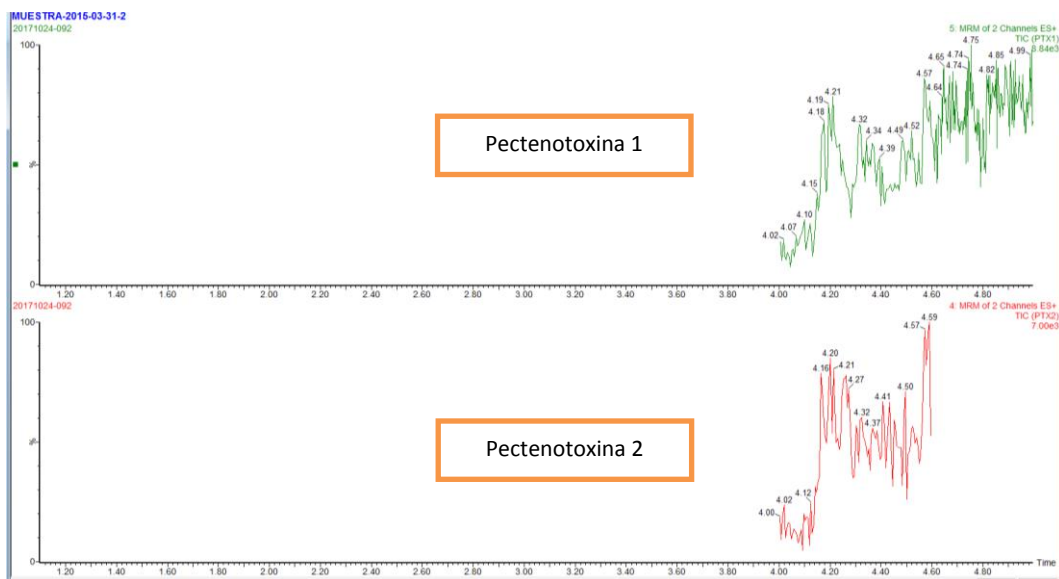
#### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

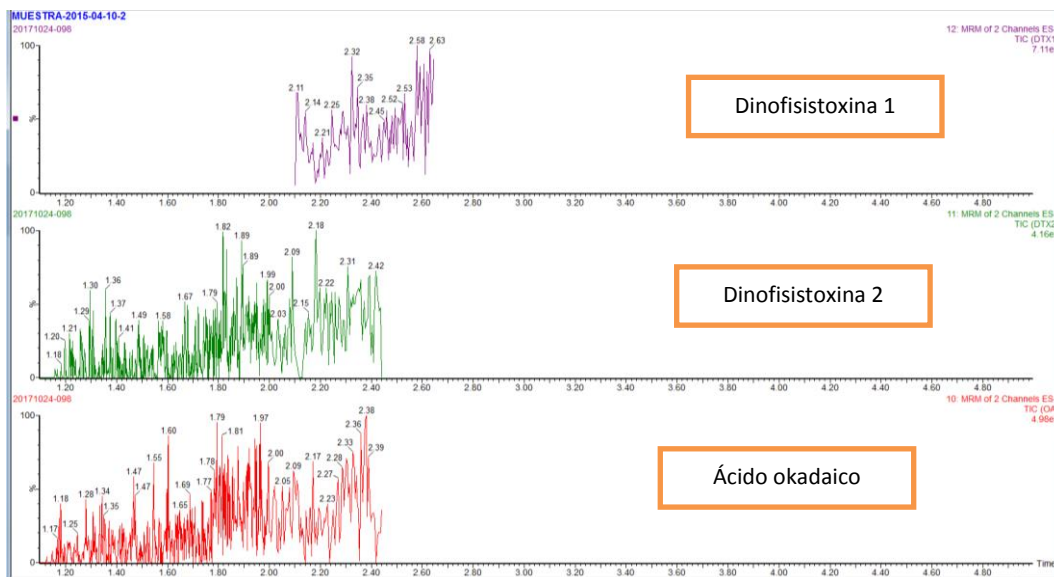


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

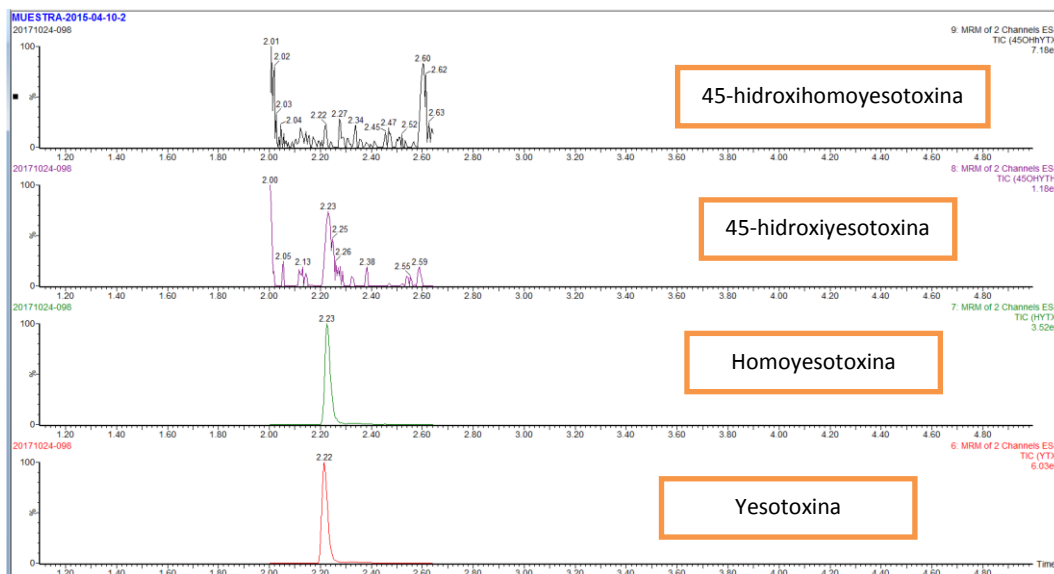


## Anexo 31. Cromatogramas muestra 2015-04-10

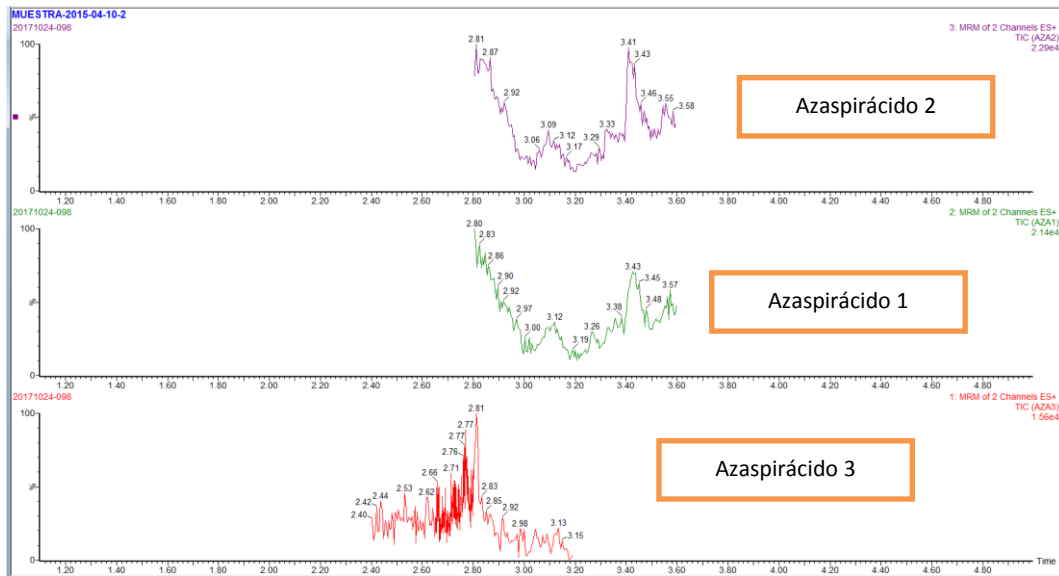
### A: Grupo del Ácido Okadaico



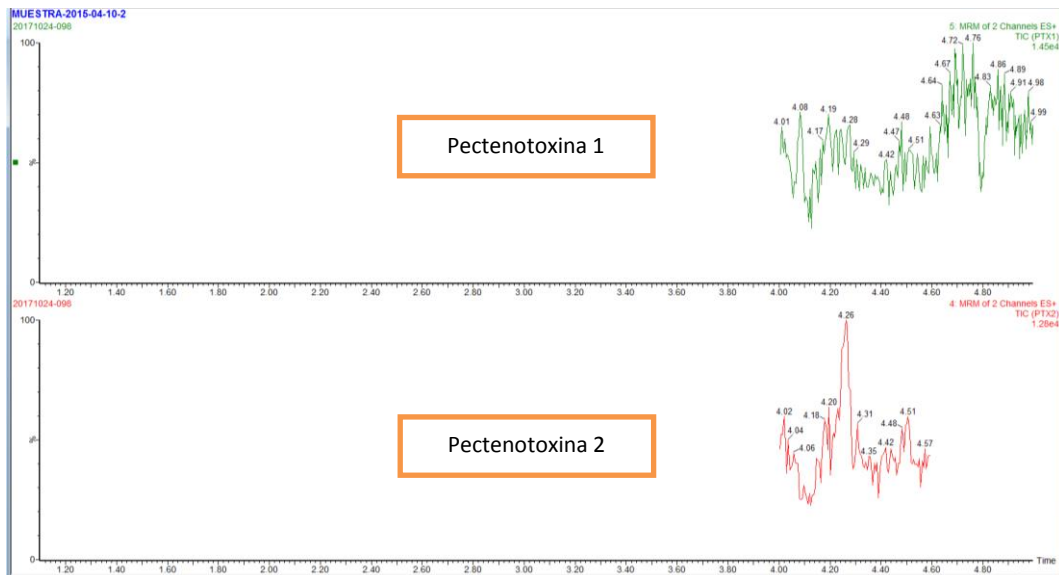
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

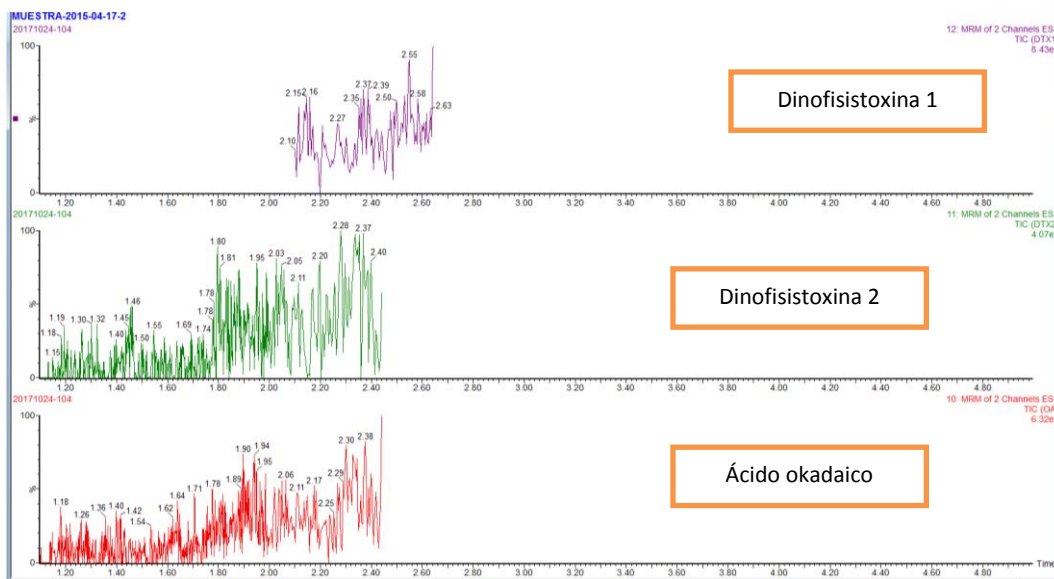


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

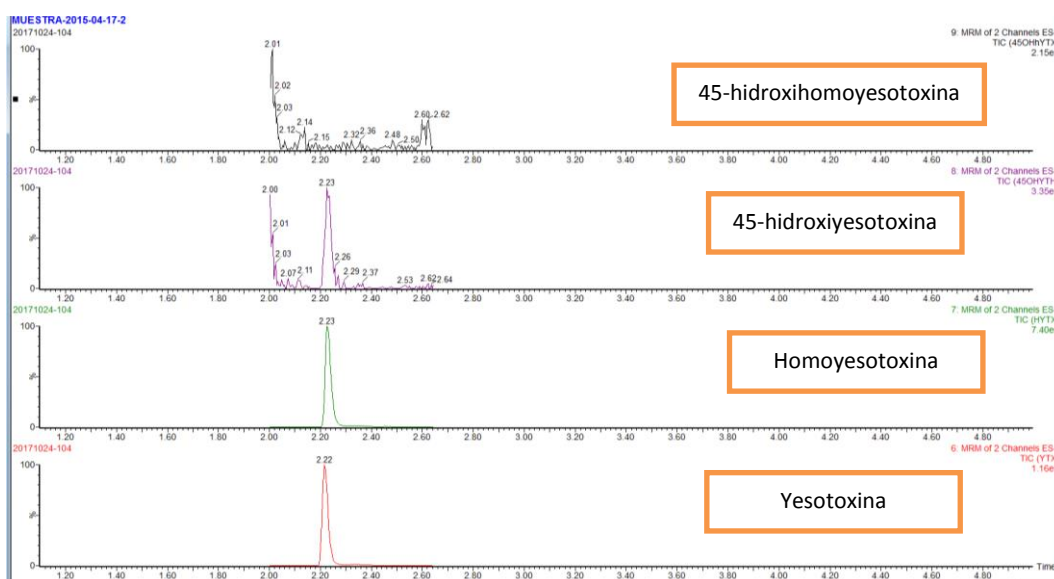


## Anexo 32. Cromatogramas muestra 2015-04-17

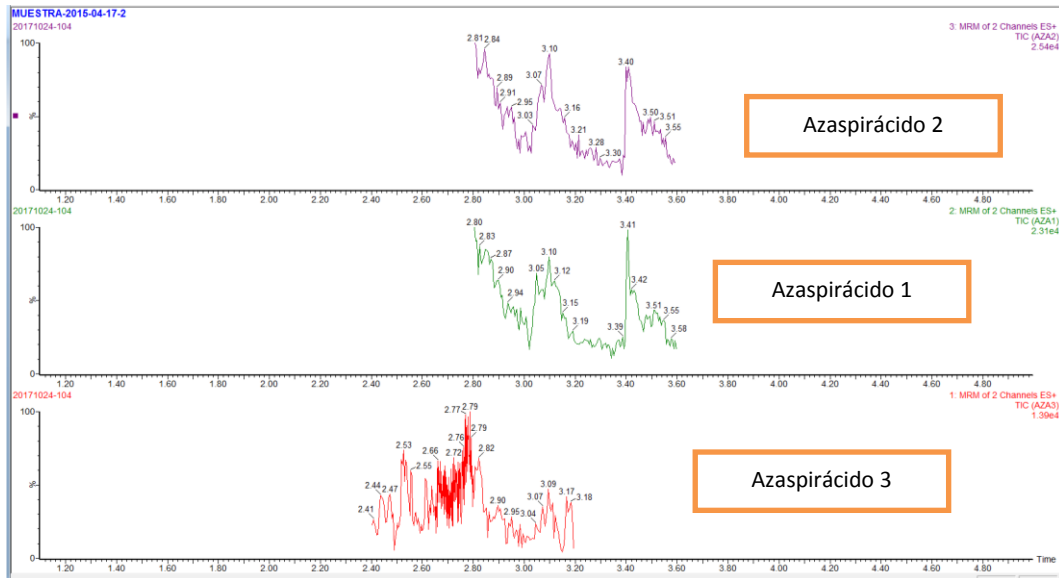
### A: Grupo del Ácido Okadaico



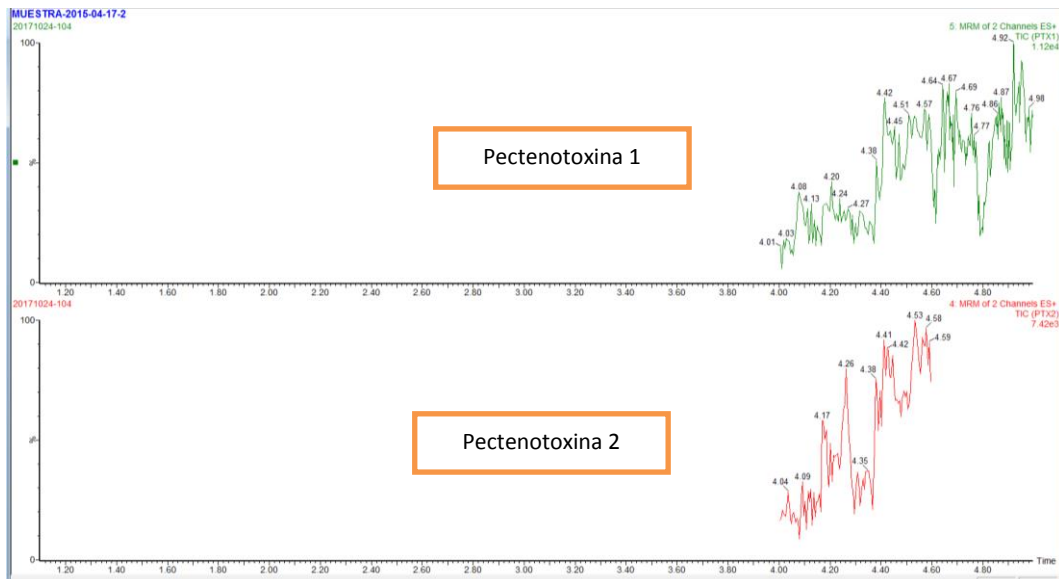
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

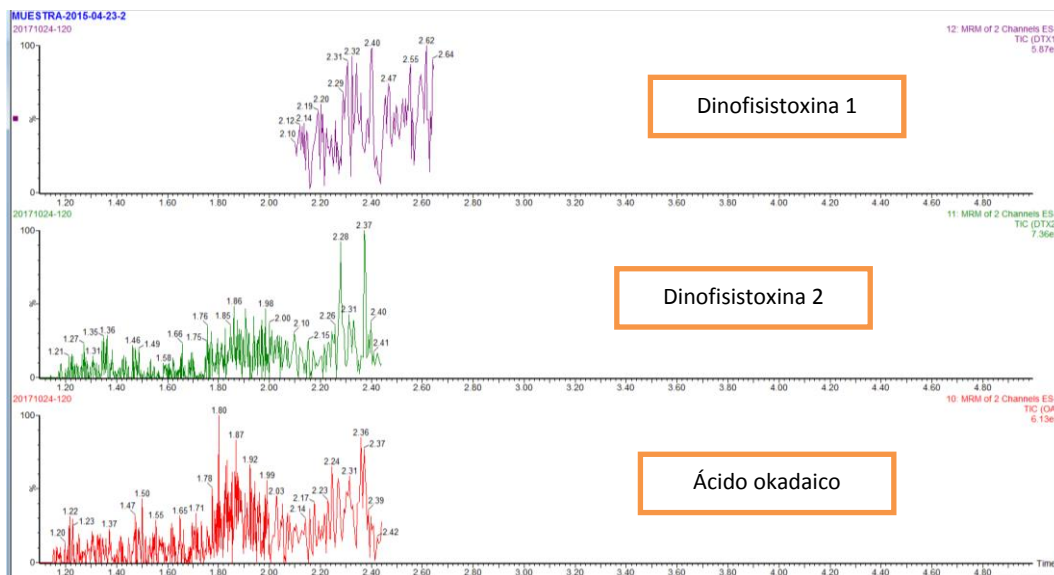


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

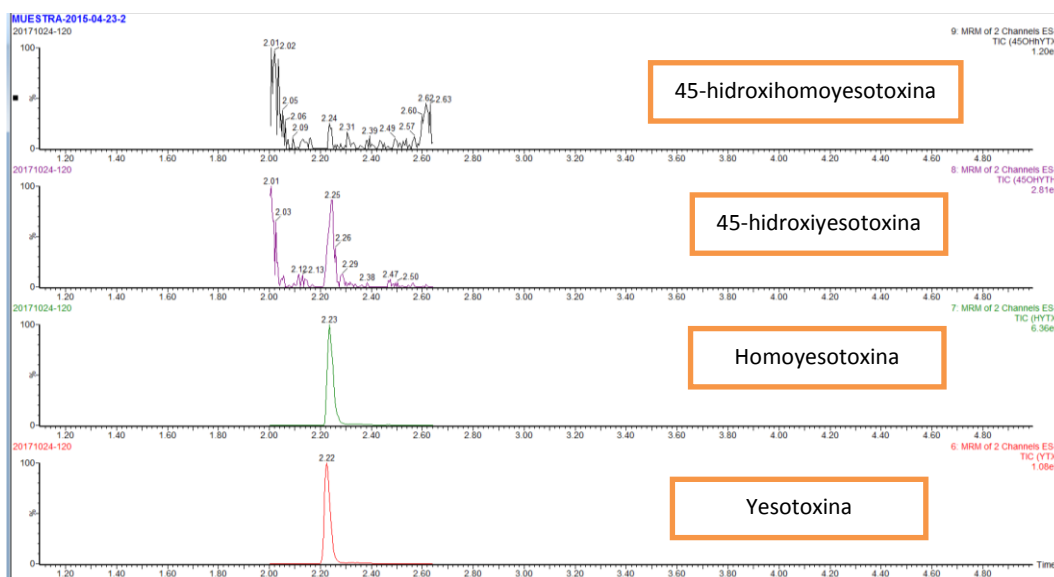


### Anexo 33. Cromatogramas muestra 2015-04-23

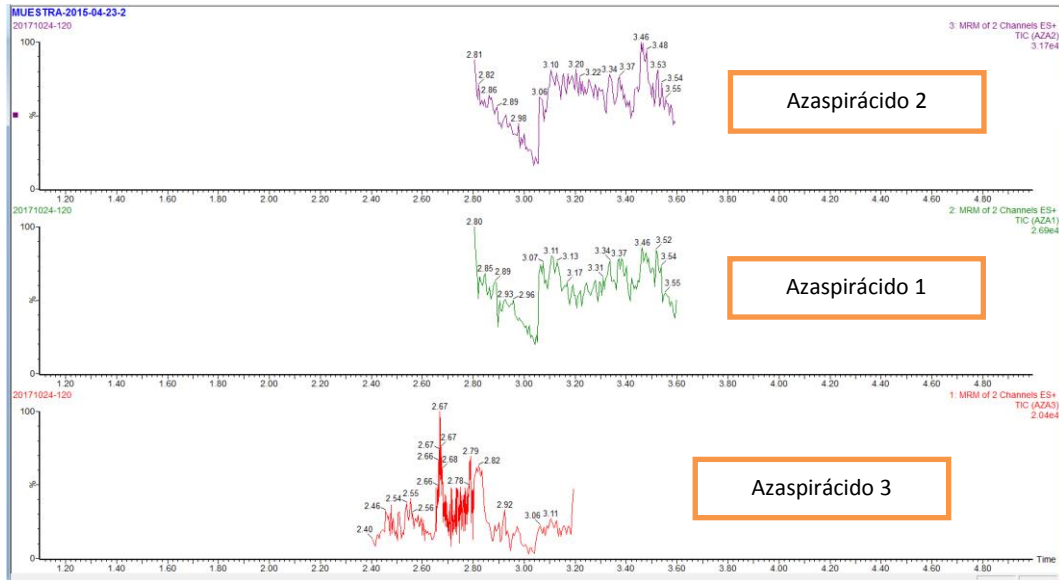
#### A: Grupo del Ácido Okadaico



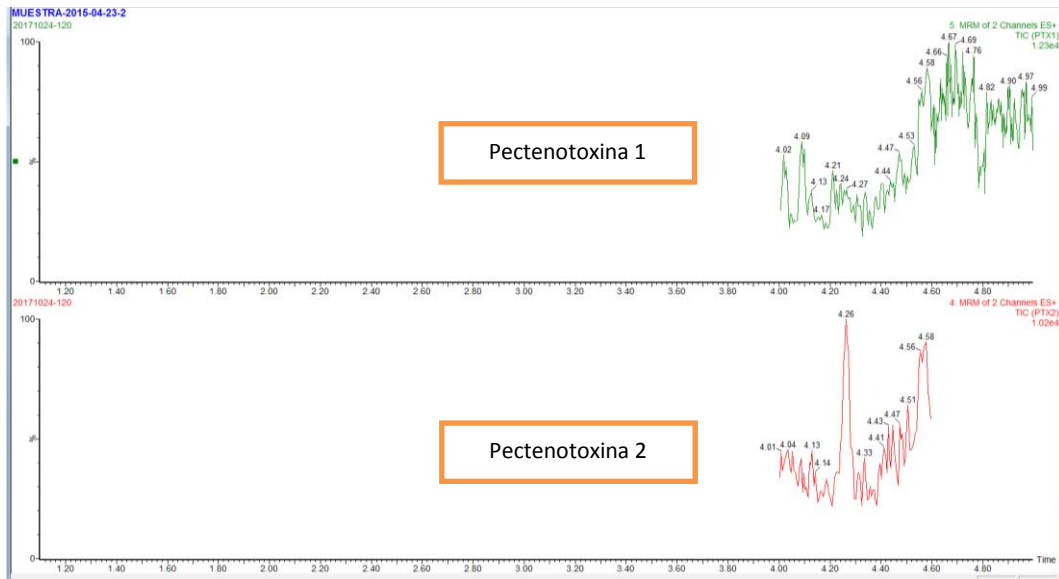
#### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

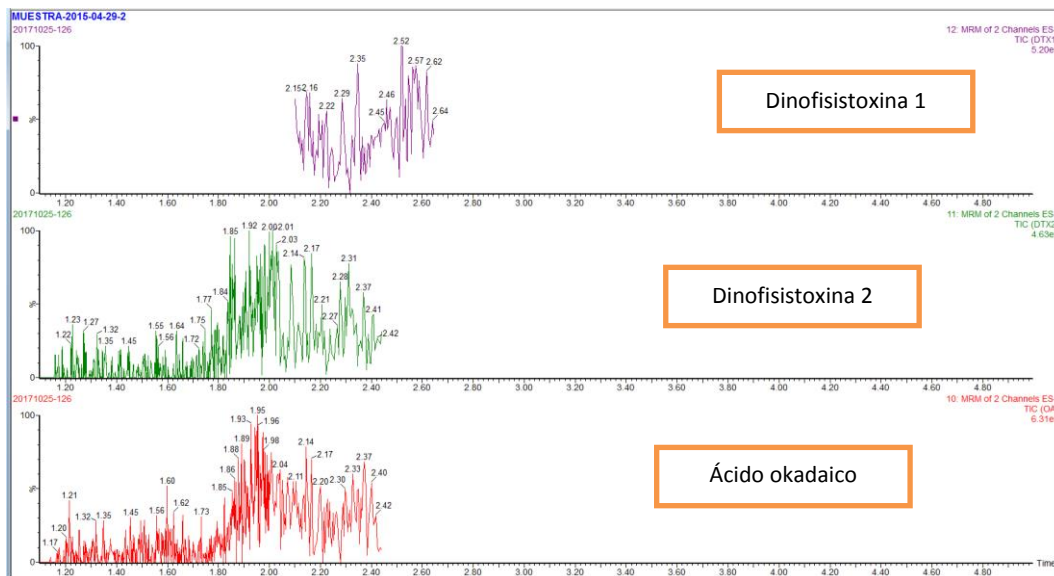


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

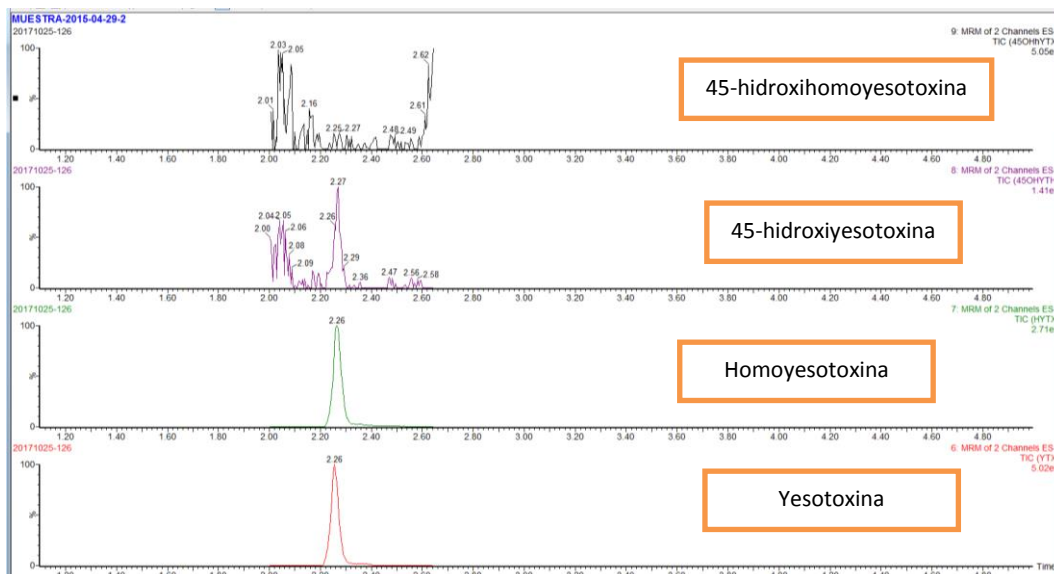


## Anexo 34. Cromatogramas muestra 2015-04-29

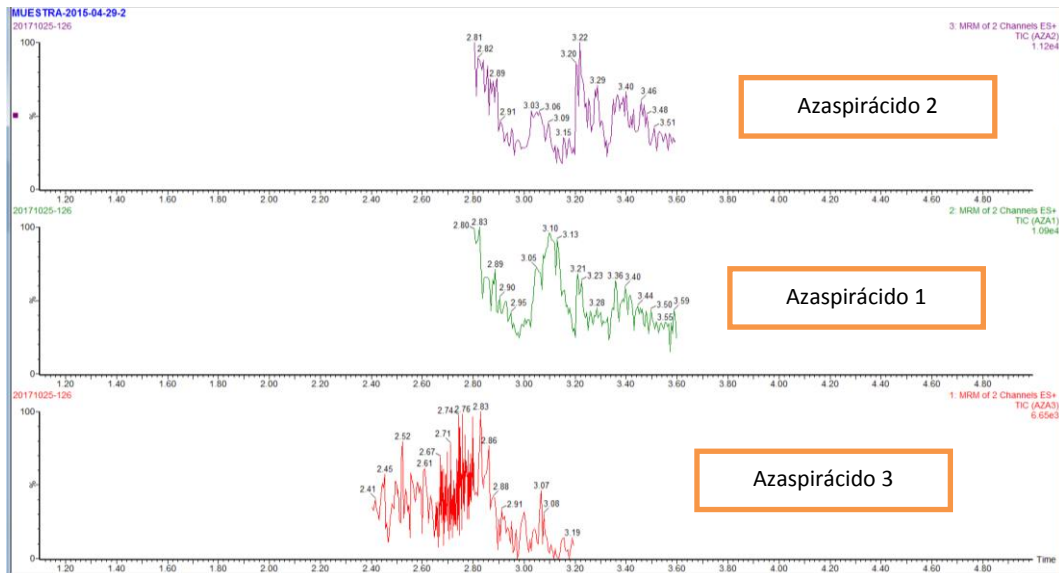
### A: Grupo del Ácido Okadaico



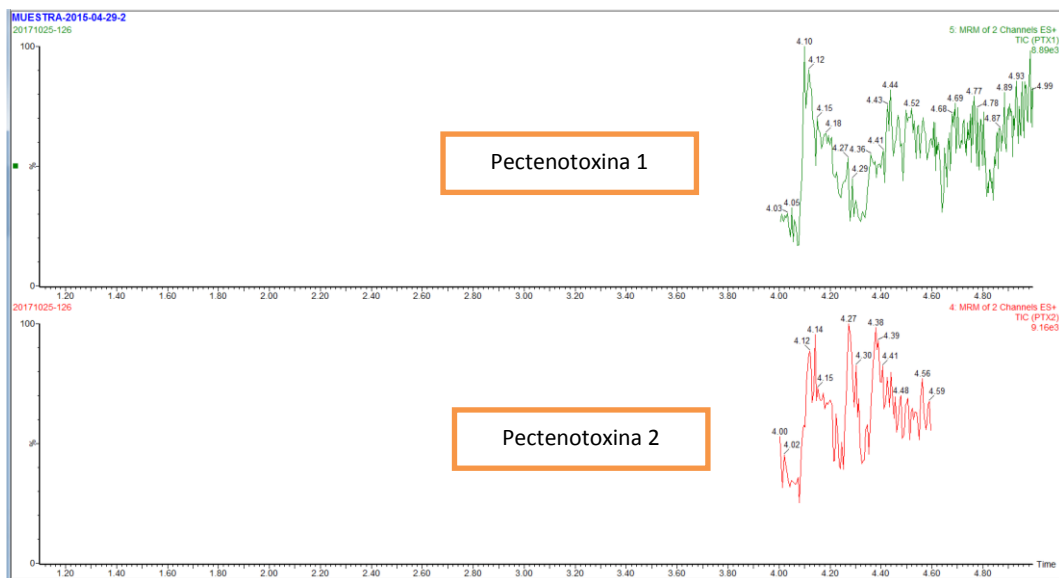
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

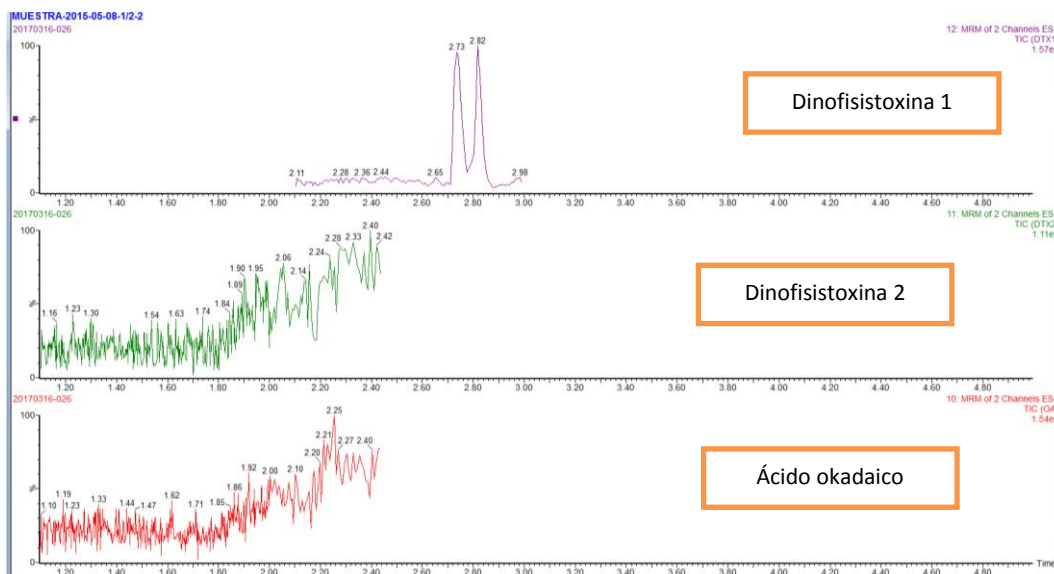


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

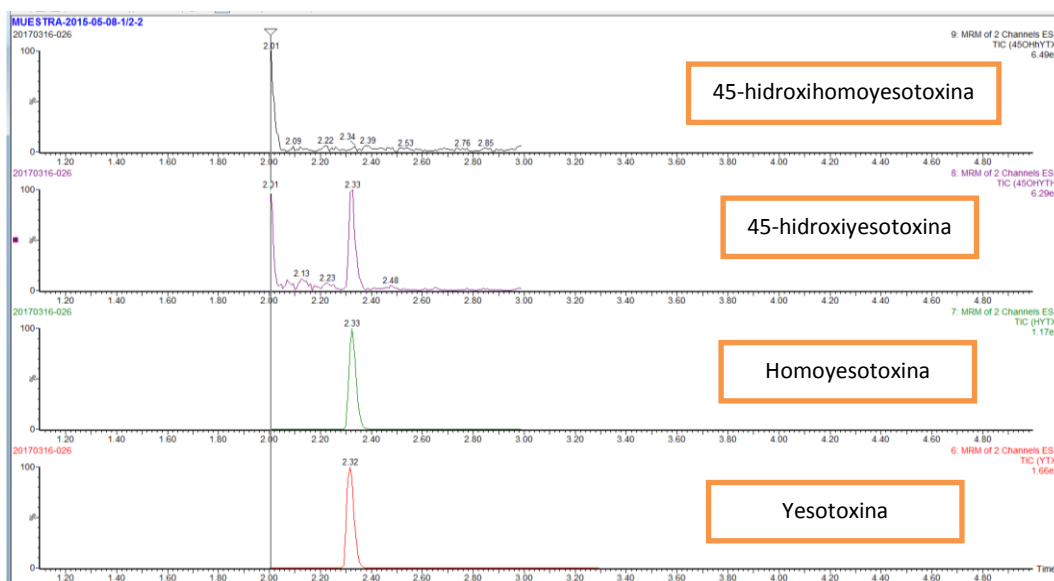


## Anexo 35. Cromatogramas muestra 2015-05-08

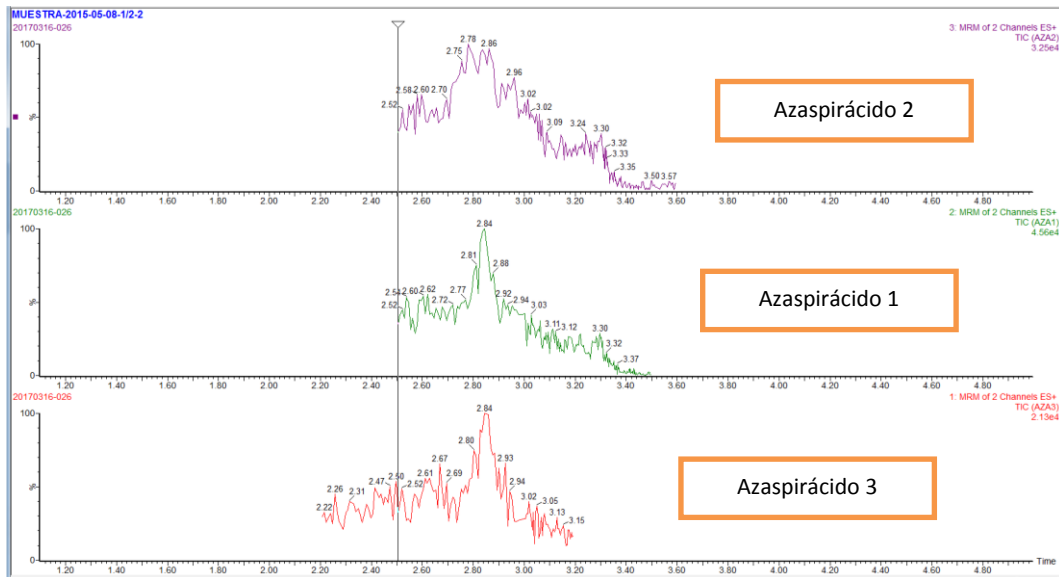
### A: Grupo del Ácido Okadaico



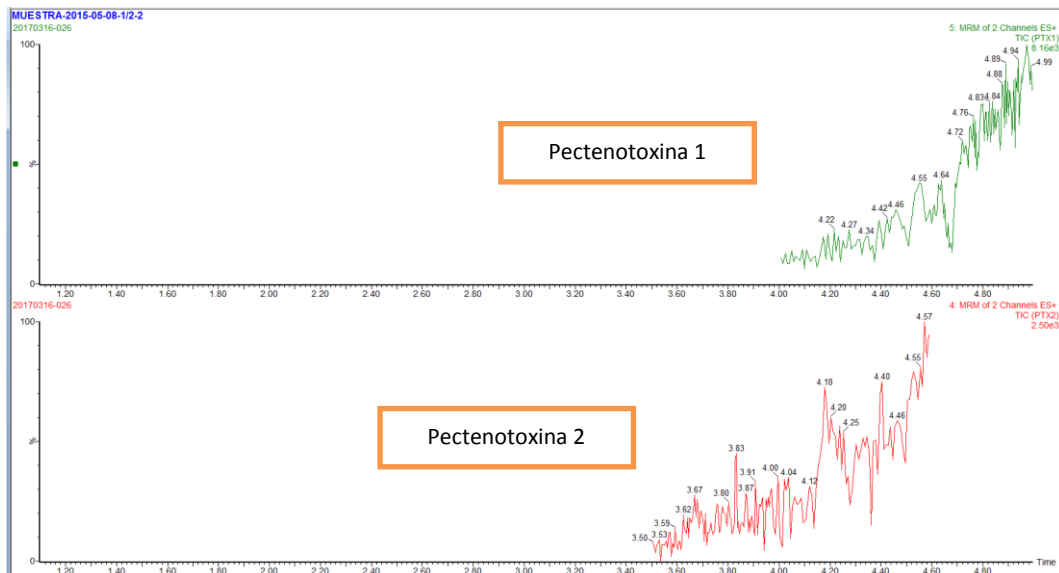
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos



### D: Grupo de las Pectenotoxinas

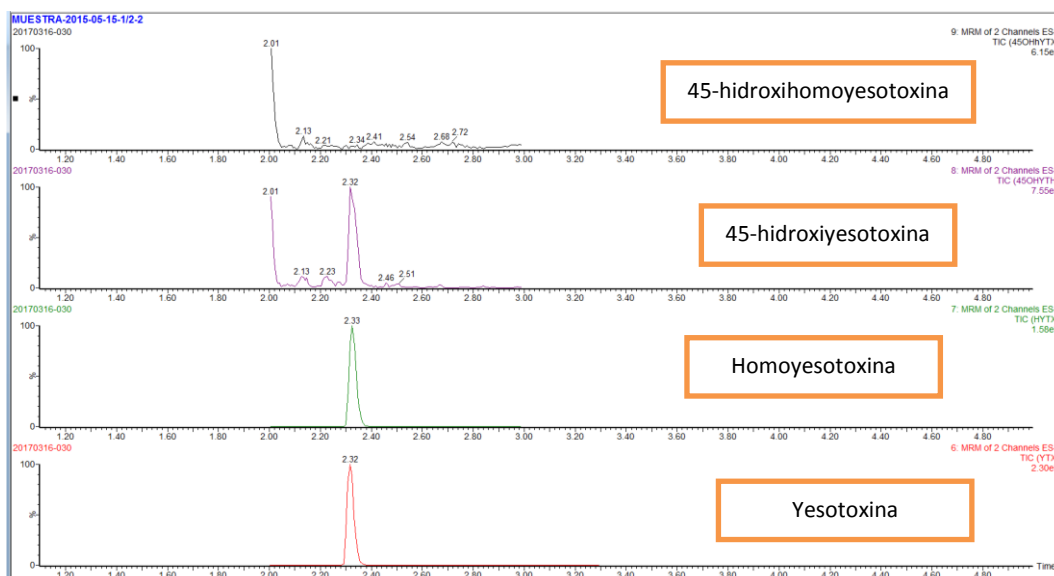


## Anexo 36. Cromatogramas muestra 2015-05-15

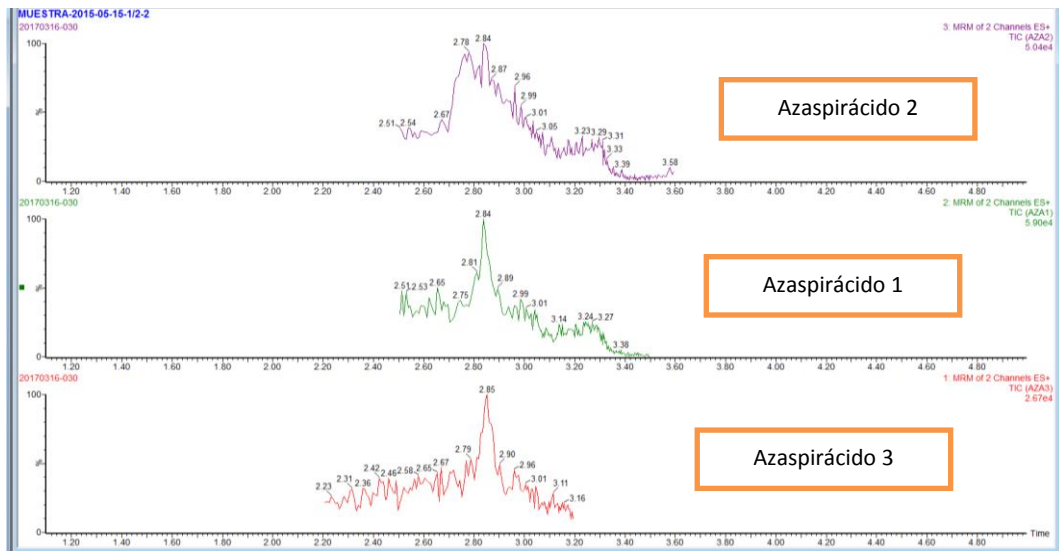
### A: Grupo del Ácido Okadaico



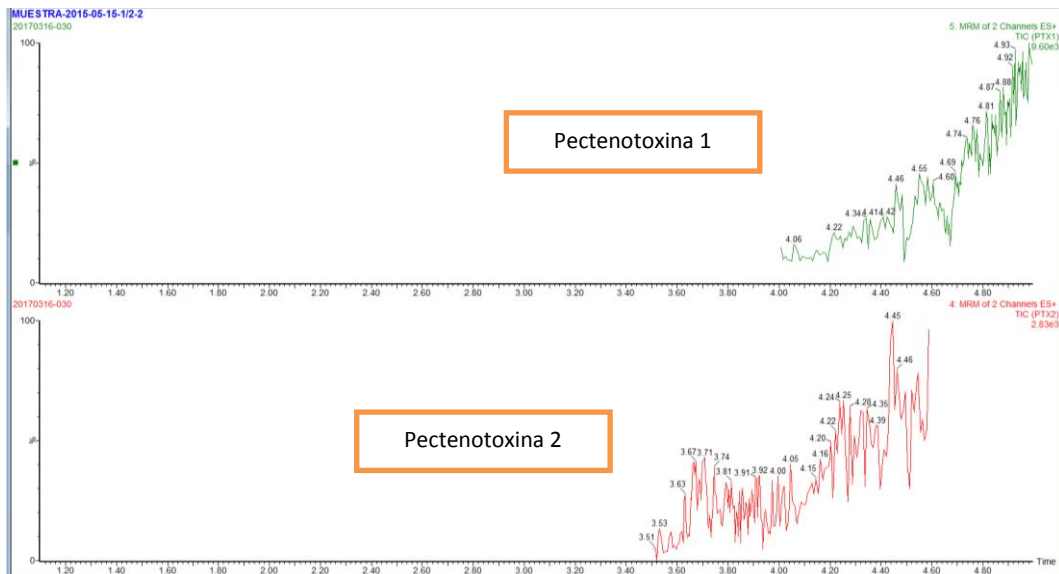
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

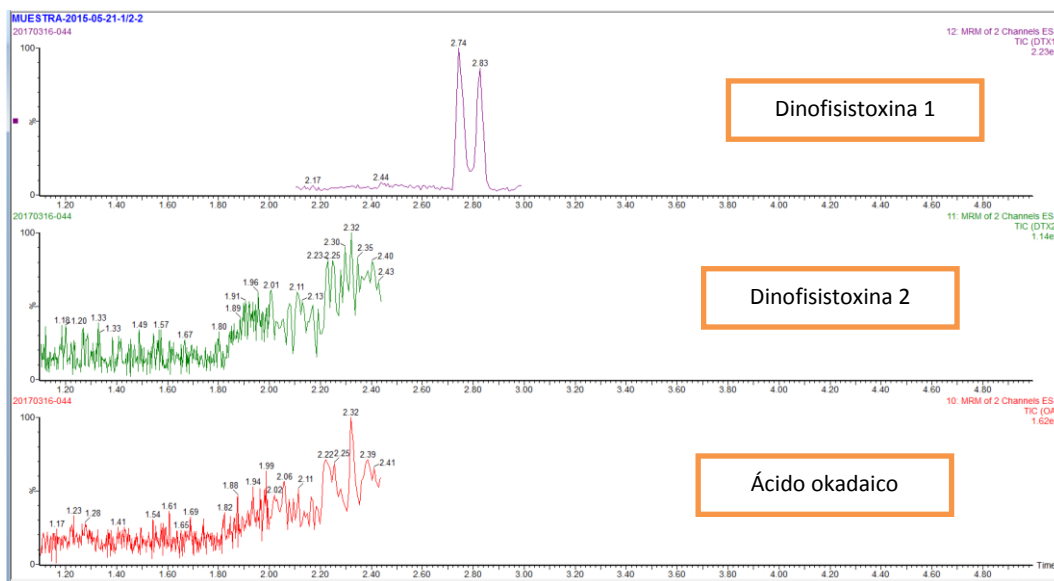


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

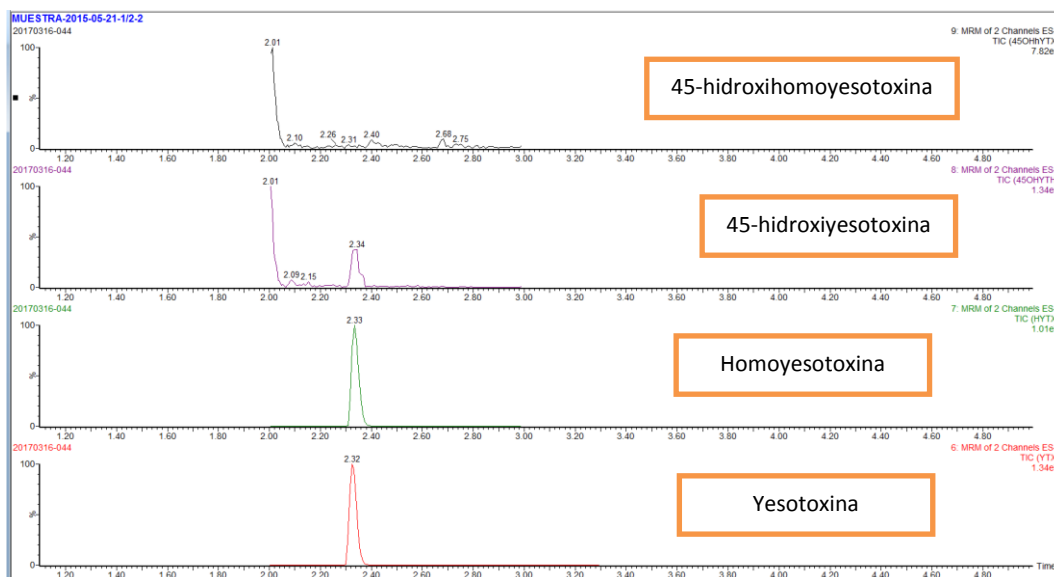


## Anexo 37. Cromatogramas muestra 2015-05-21

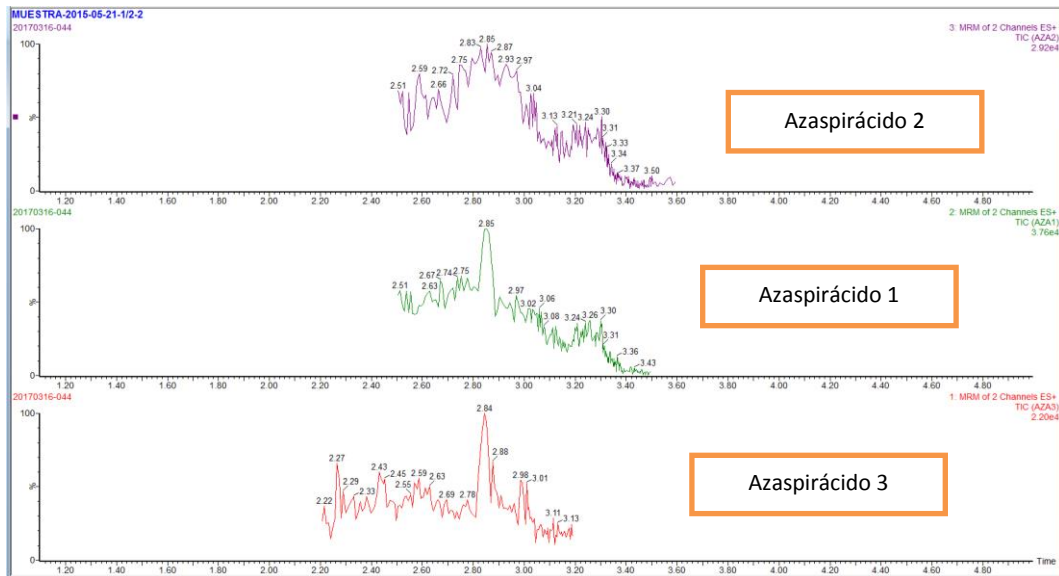
### A: Grupo del Ácido Okadaico



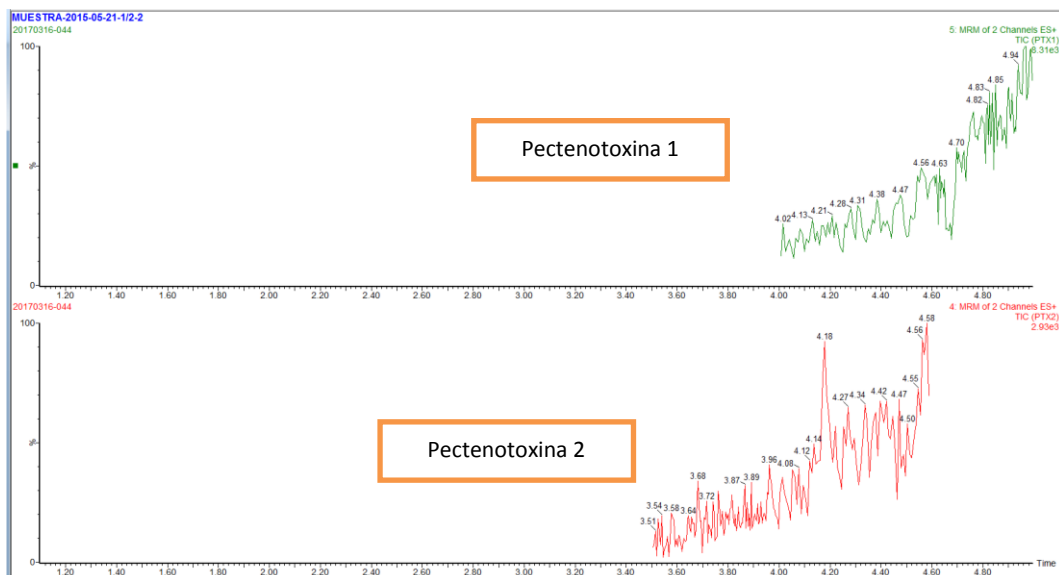
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

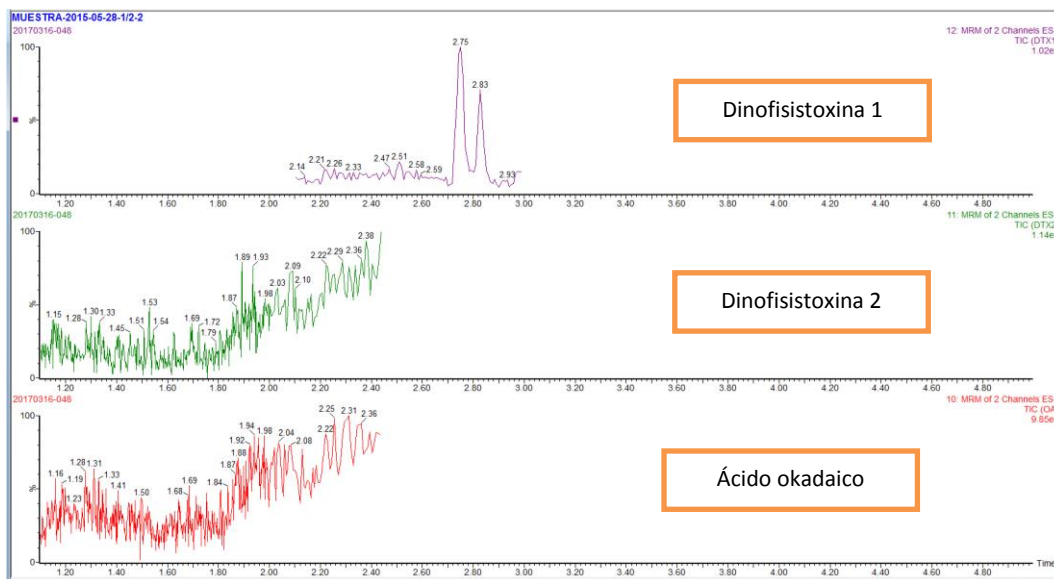


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

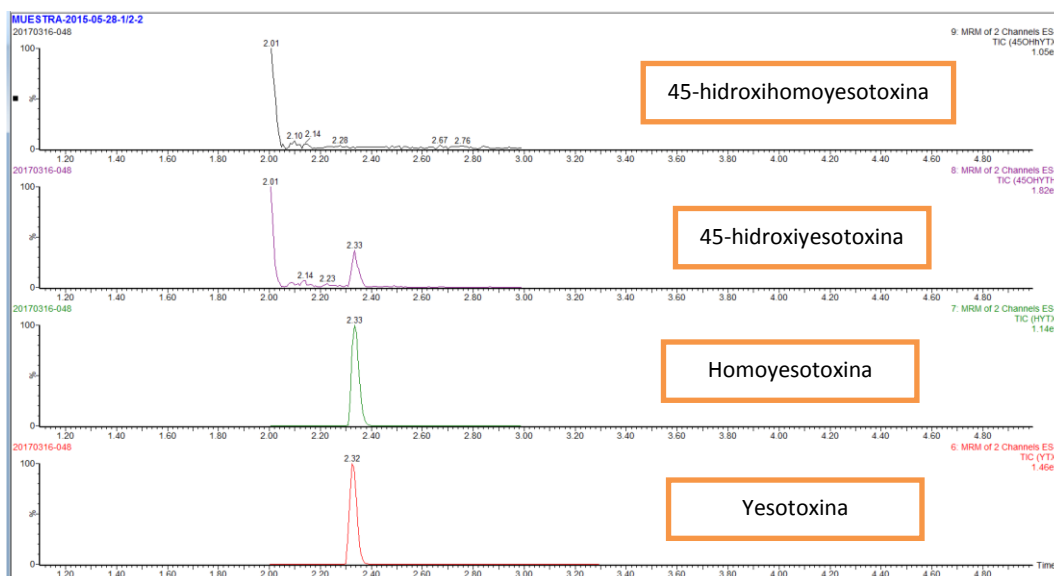


## Anexo 38. Cromatogramas muestra 2015-05-28

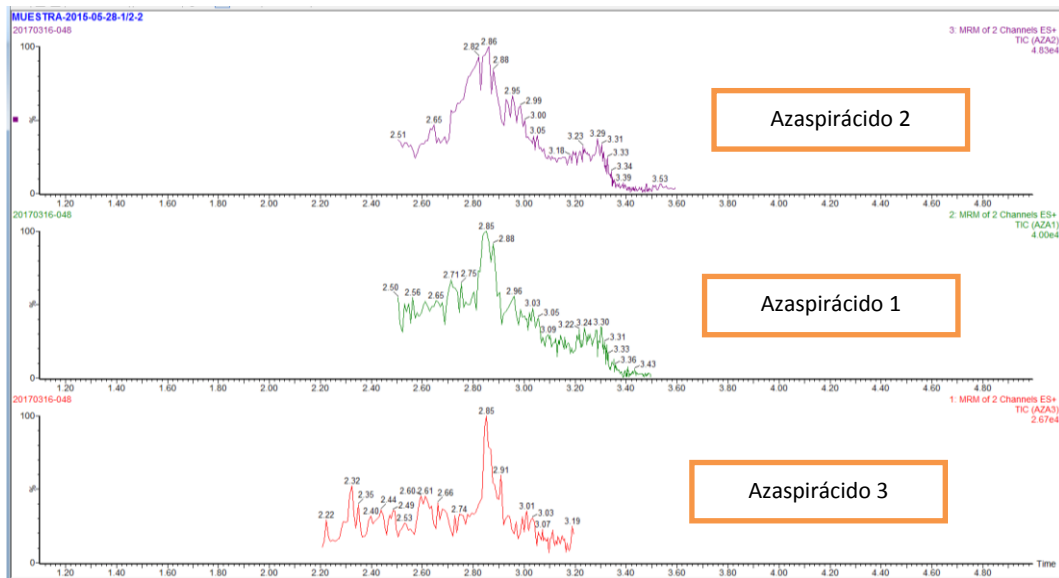
### A: Grupo del Ácido Okadaico



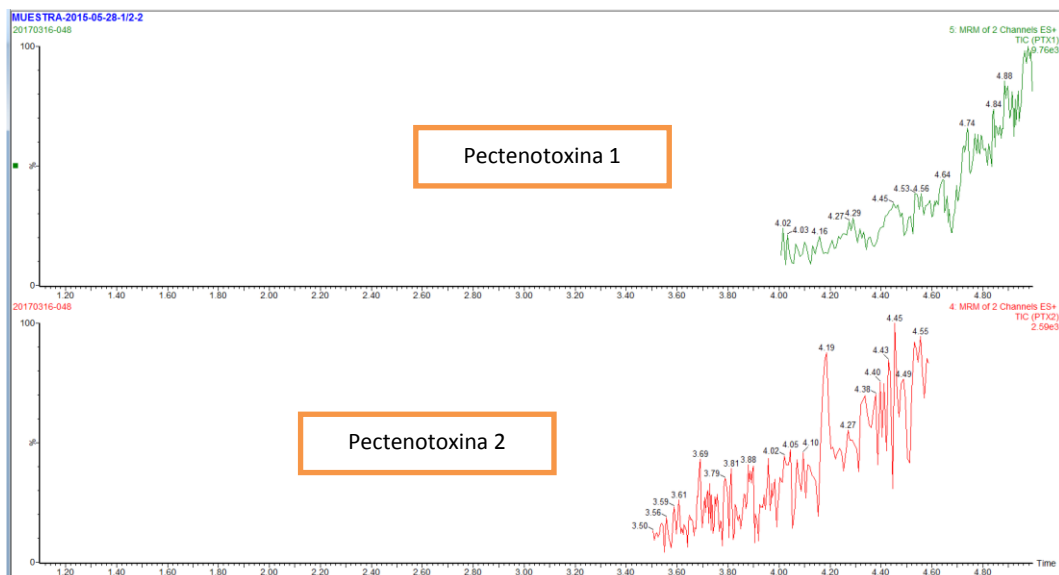
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

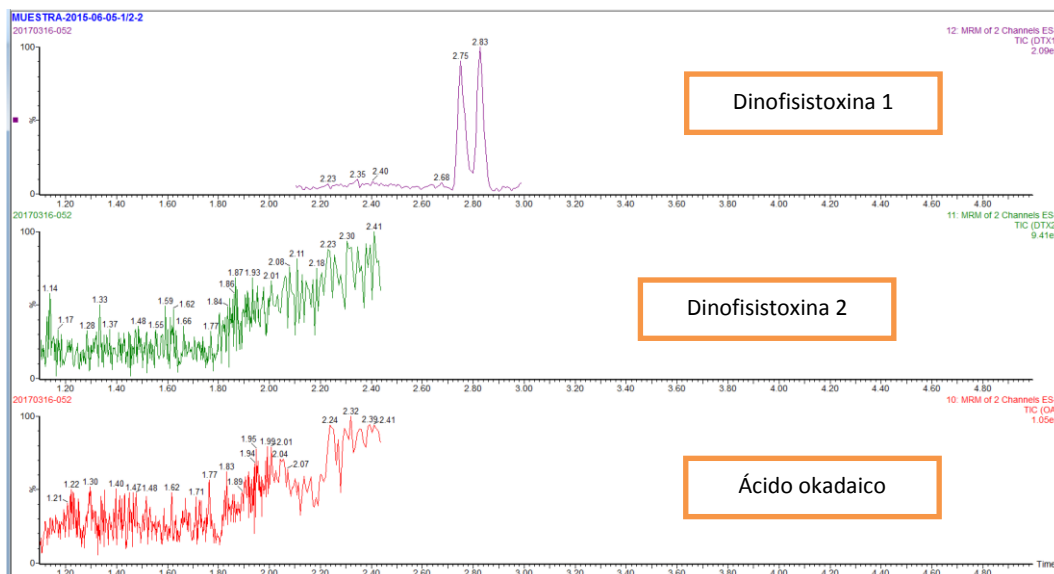


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

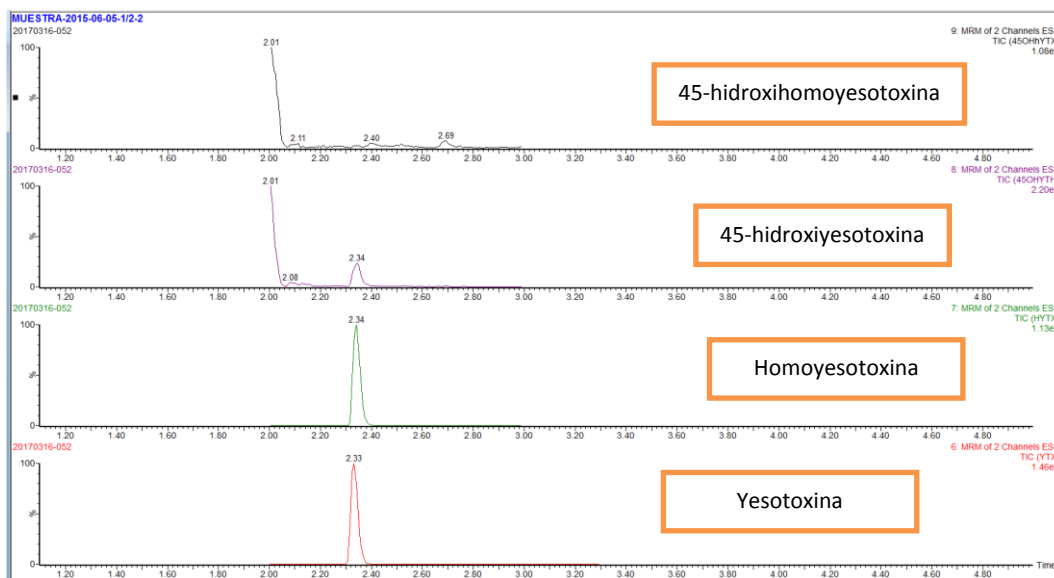


## Anexo 39. Cromatogramas muestra 2015-06-05

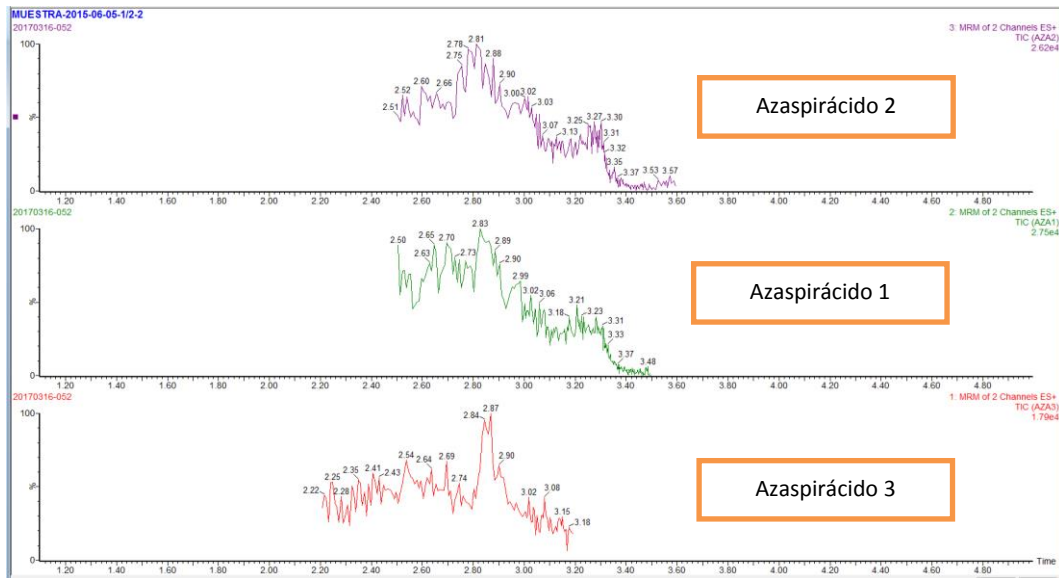
### A: Grupo del Ácido Okadaico



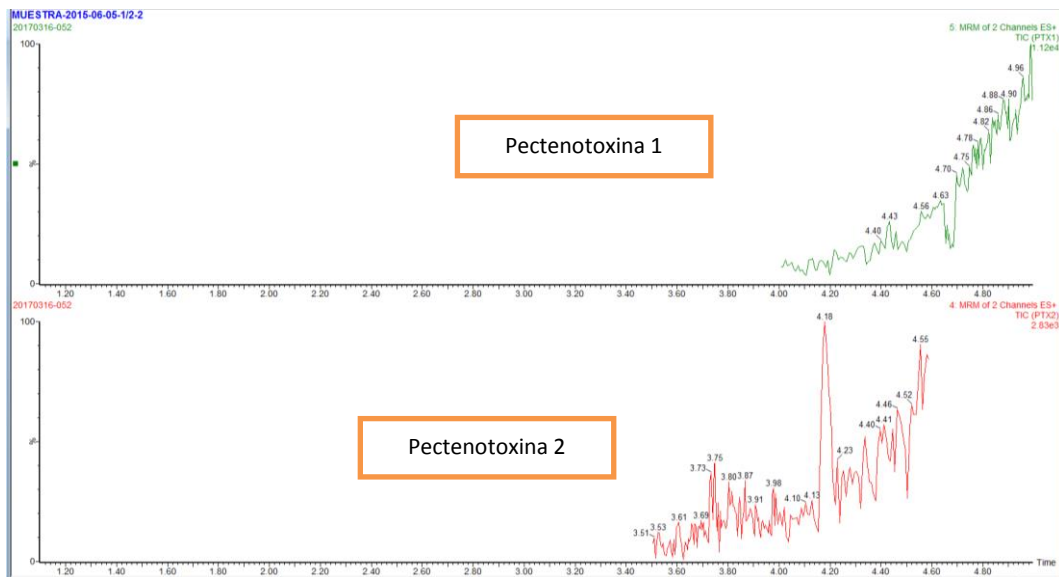
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

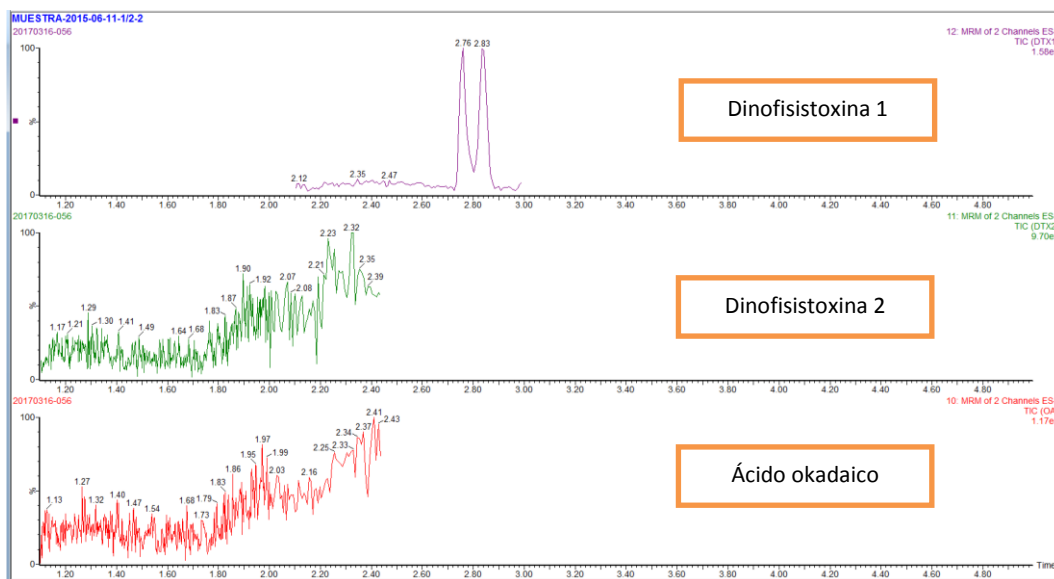


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

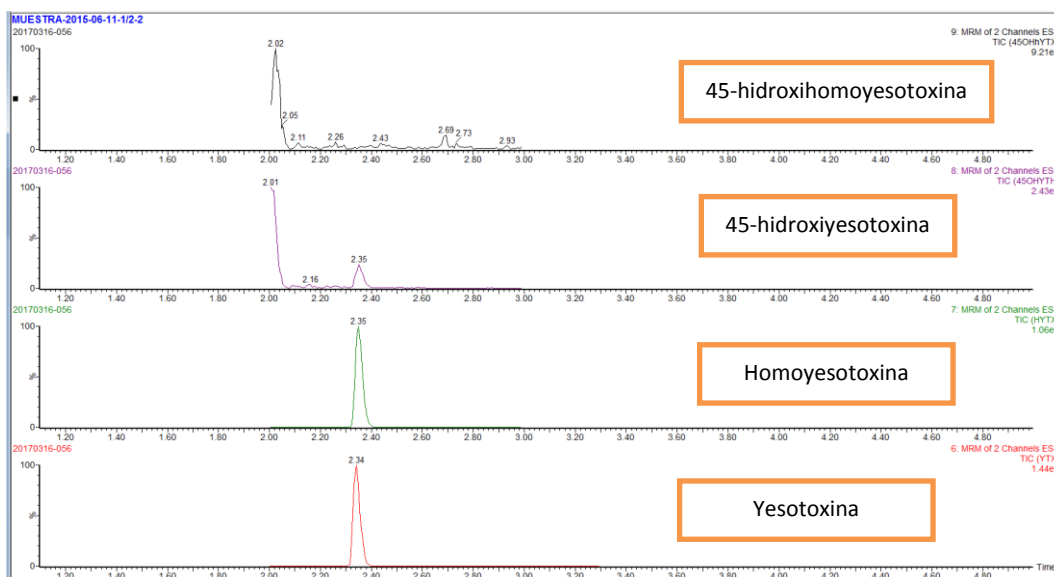


## Anexo 40. Cromatogramas muestra 2015-06-11

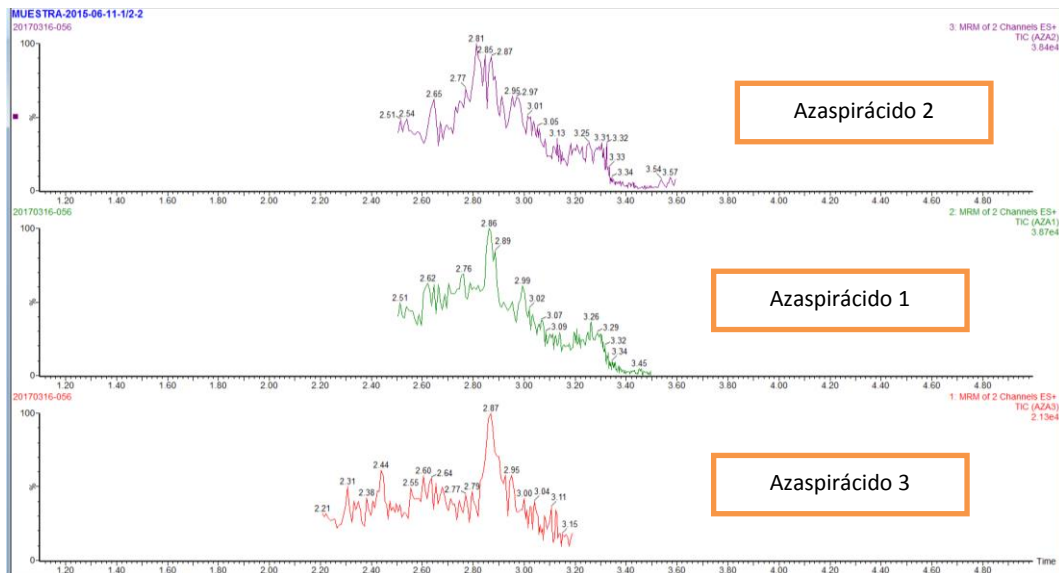
### A: Grupo del Ácido Okadaico



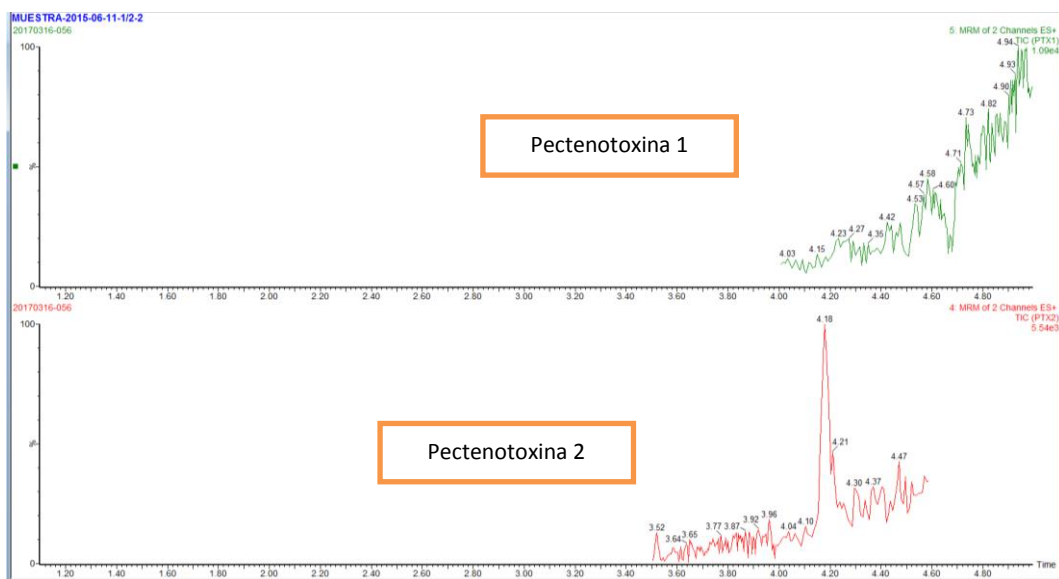
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

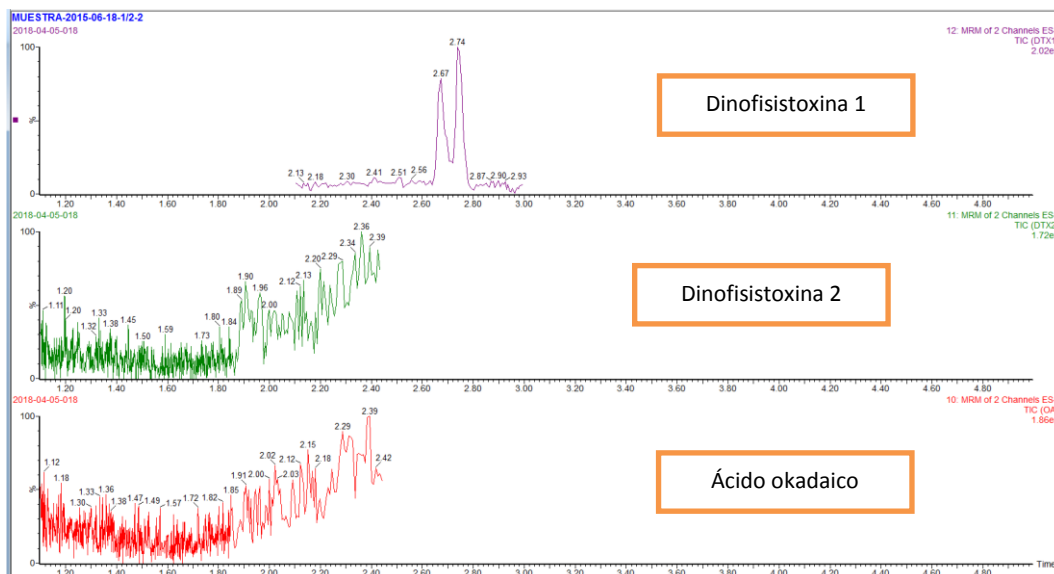


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

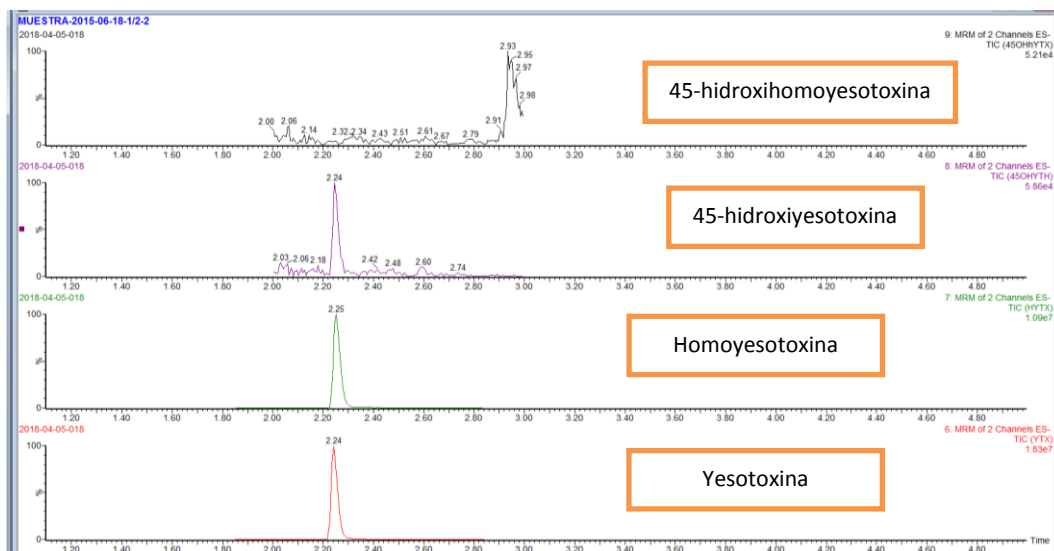


## Anexo 41. Cromatogramas muestra 2015-06-18

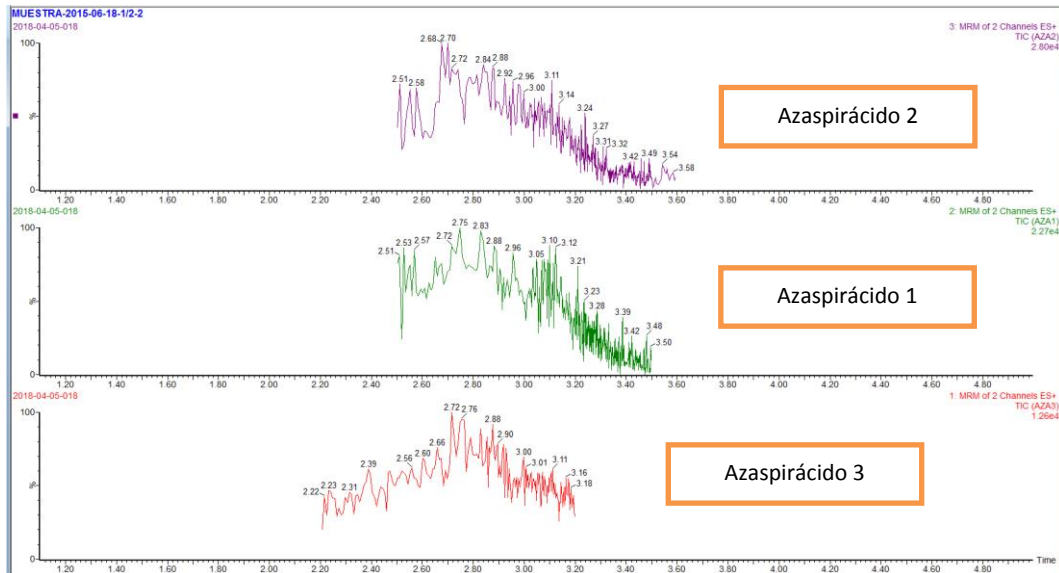
### A: Grupo del Ácido Okadaico



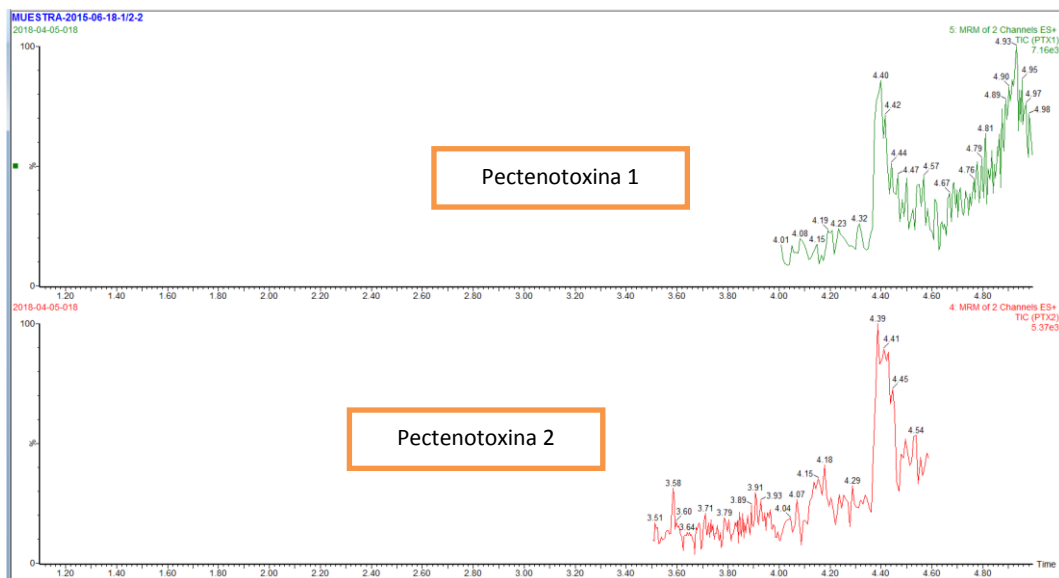
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

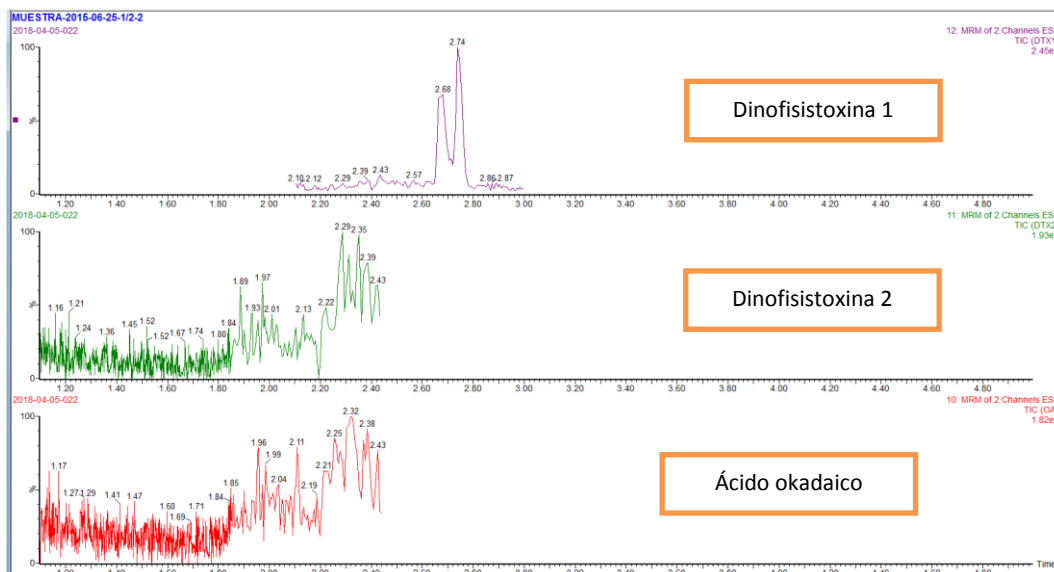


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

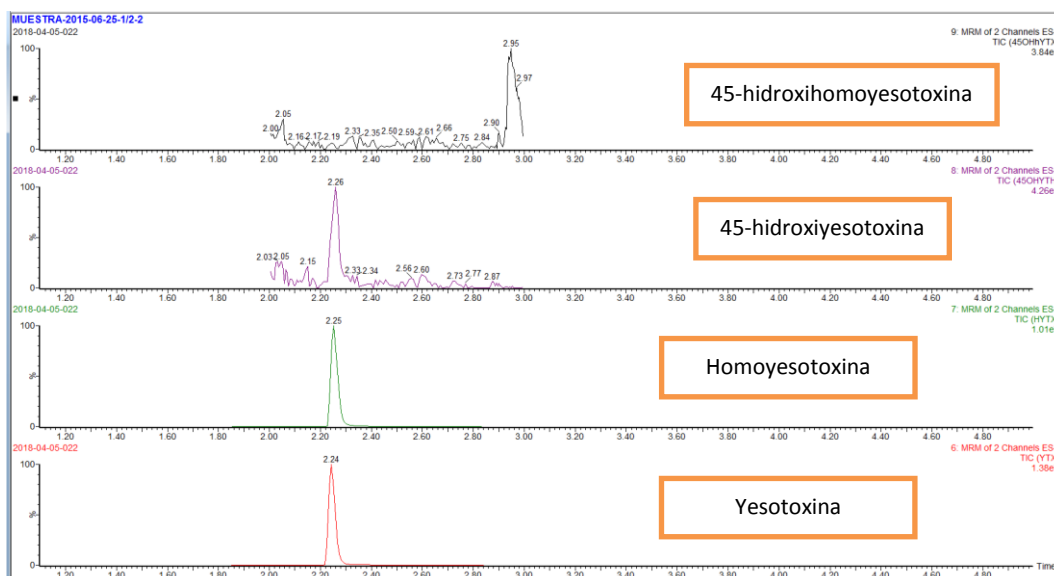


## Anexo 42. Cromatogramas muestra 2015-06-25

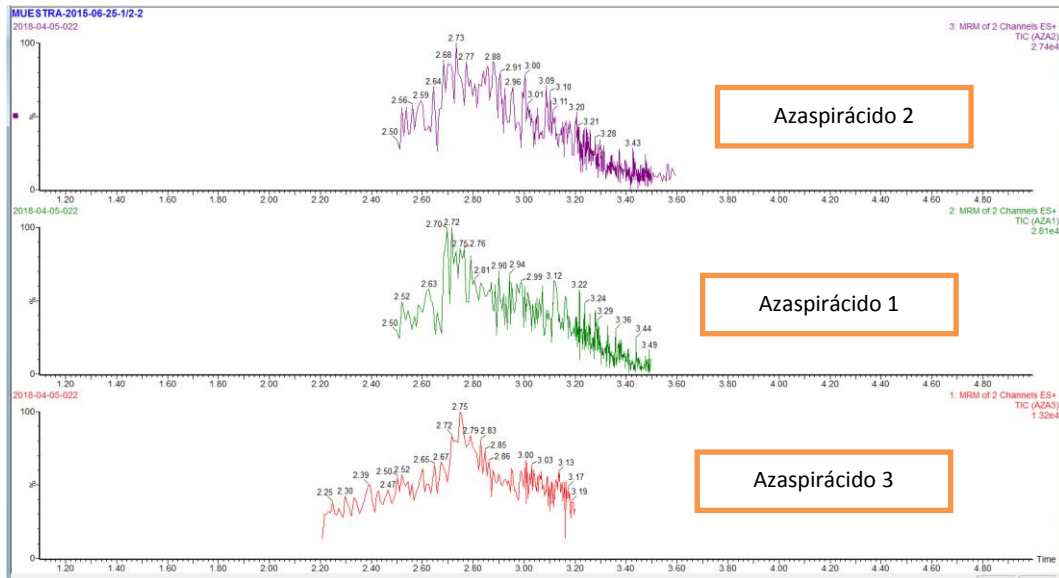
### A: Grupo del Ácido Okadaico



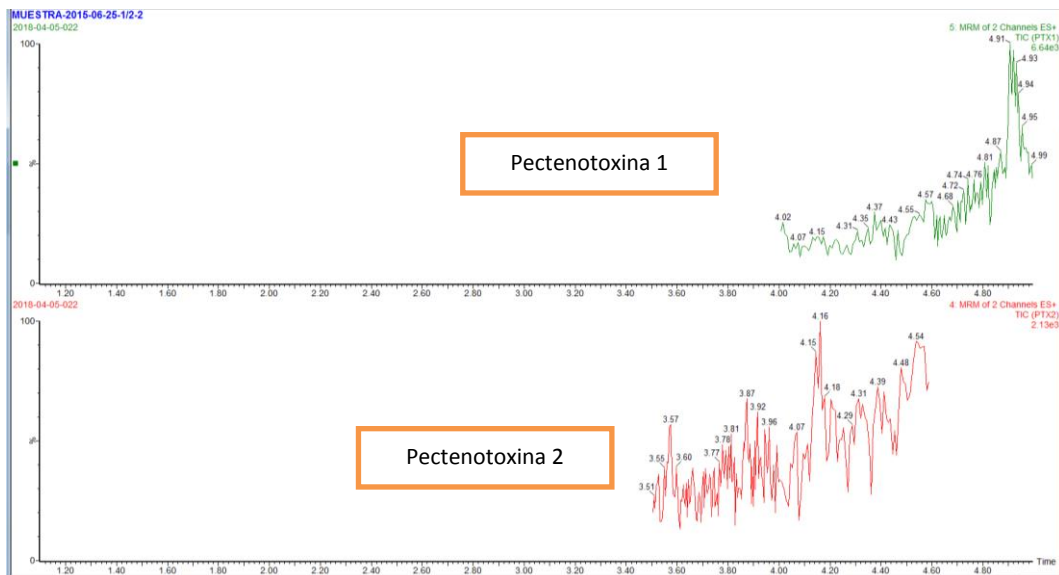
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

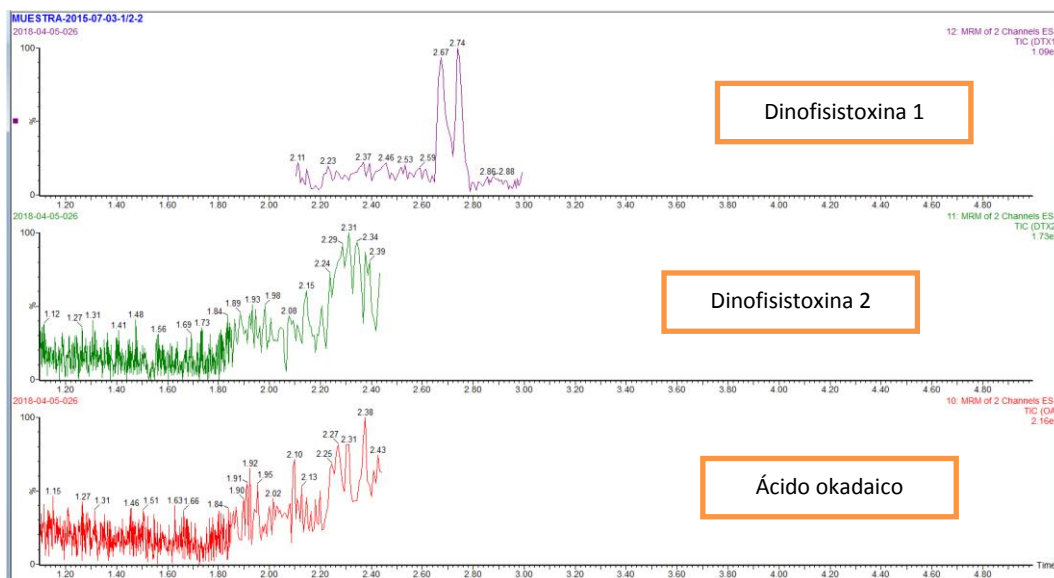


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

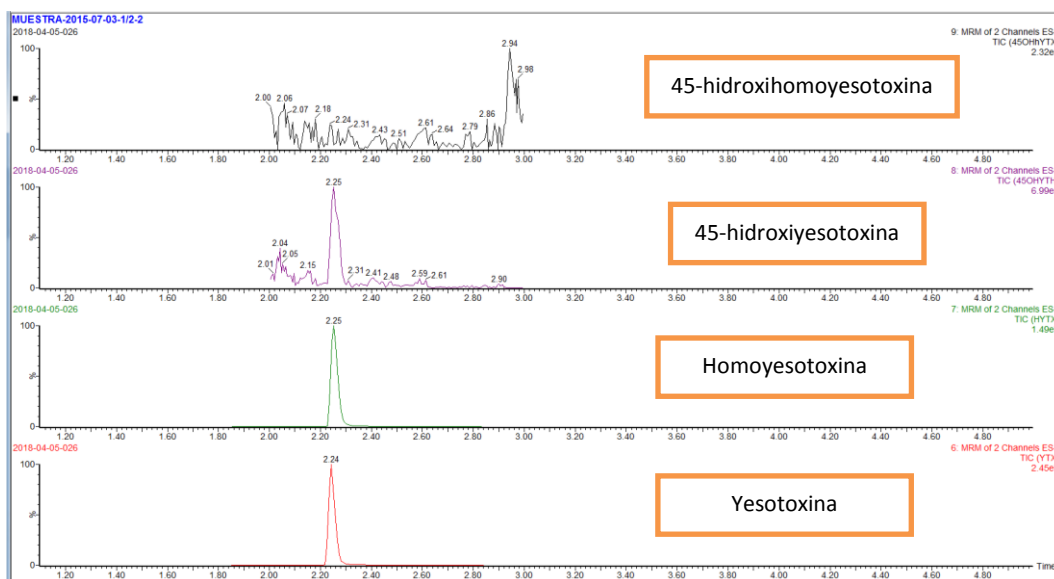


### Anexo 43. Cromatogramas muestra 2015-07-03

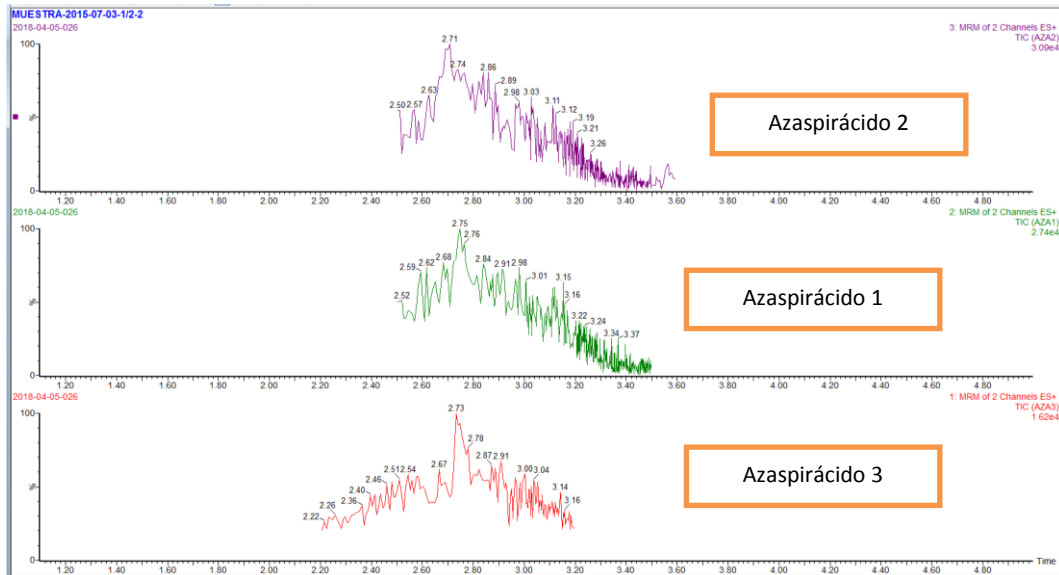
#### A: Grupo del Ácido Okadaico



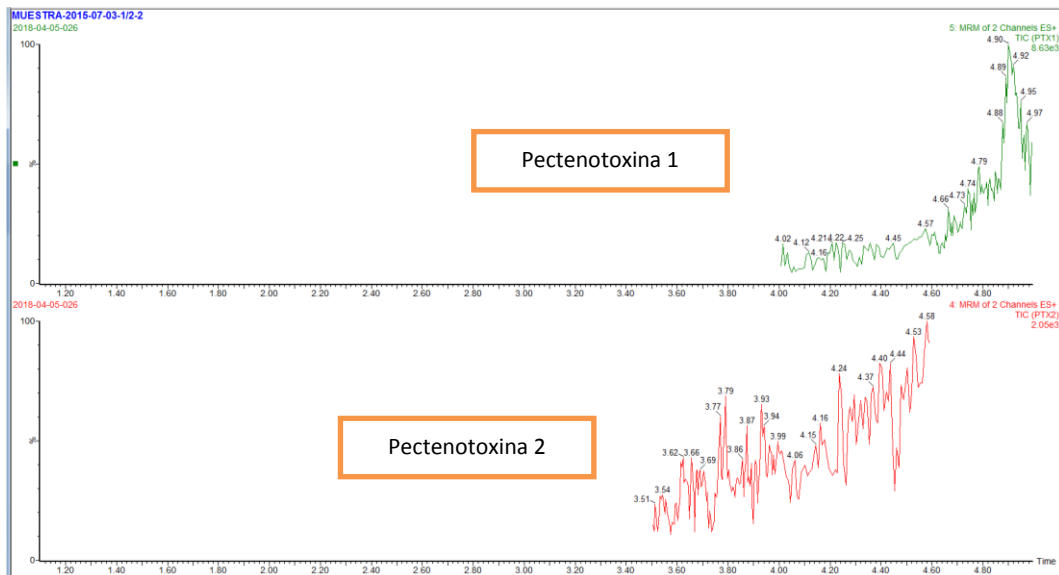
#### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

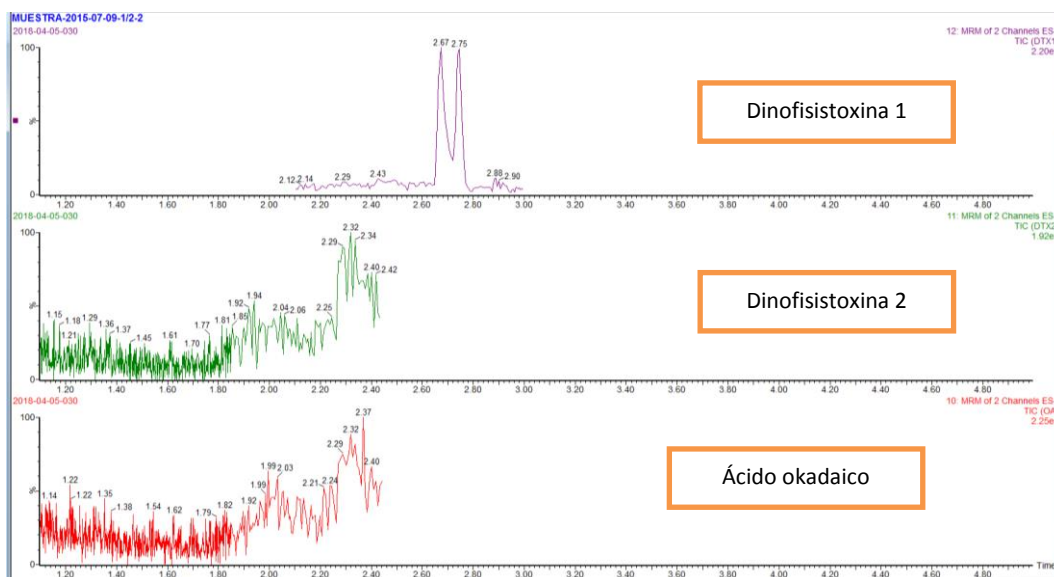


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

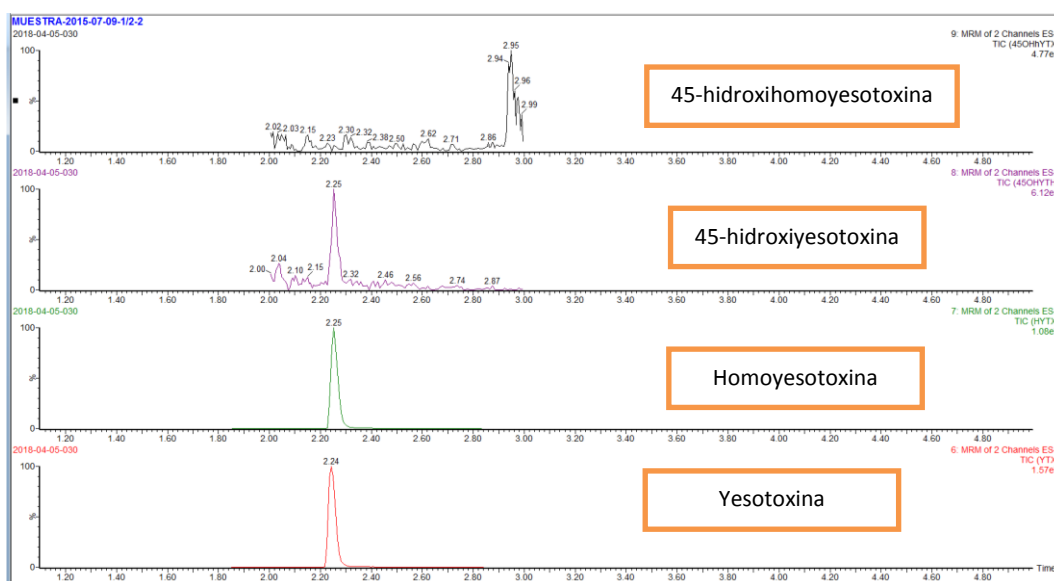


## Anexo 44. Cromatogramas muestra 2015-07-09

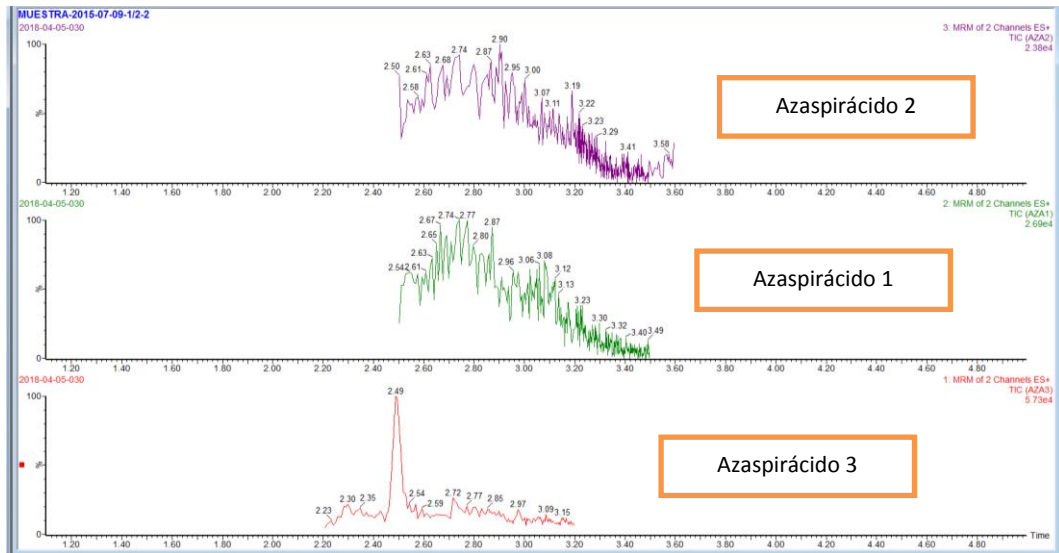
### A: Grupo del Ácido Okadaico



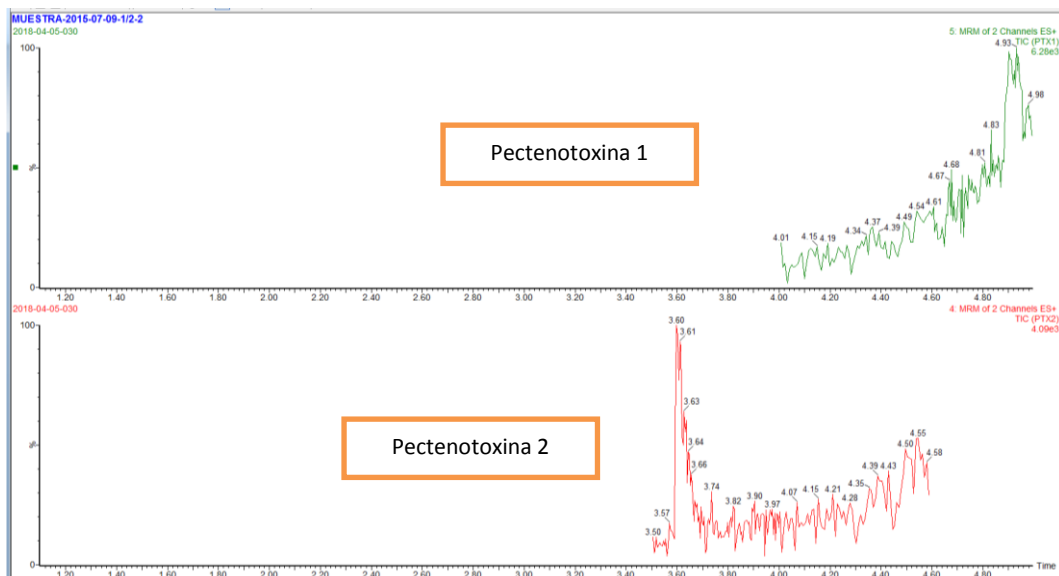
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

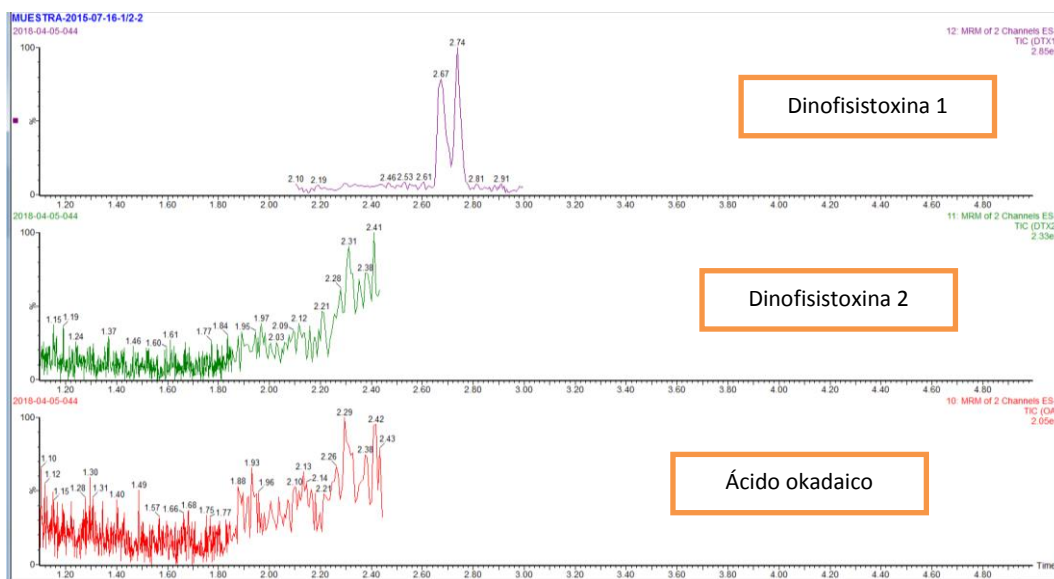


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

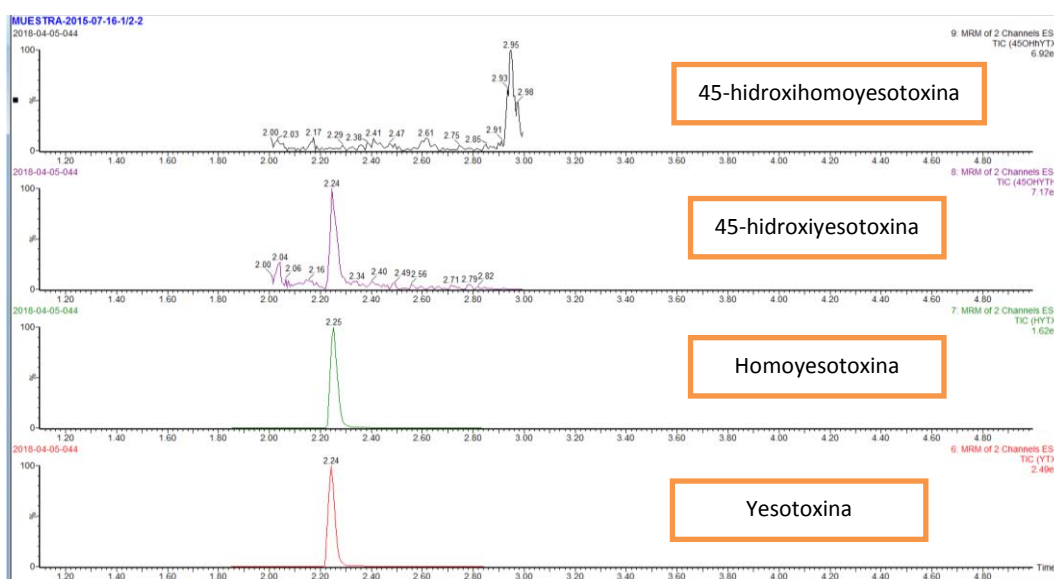


## Anexo 45. Cromatogramas muestra 2015-07-16

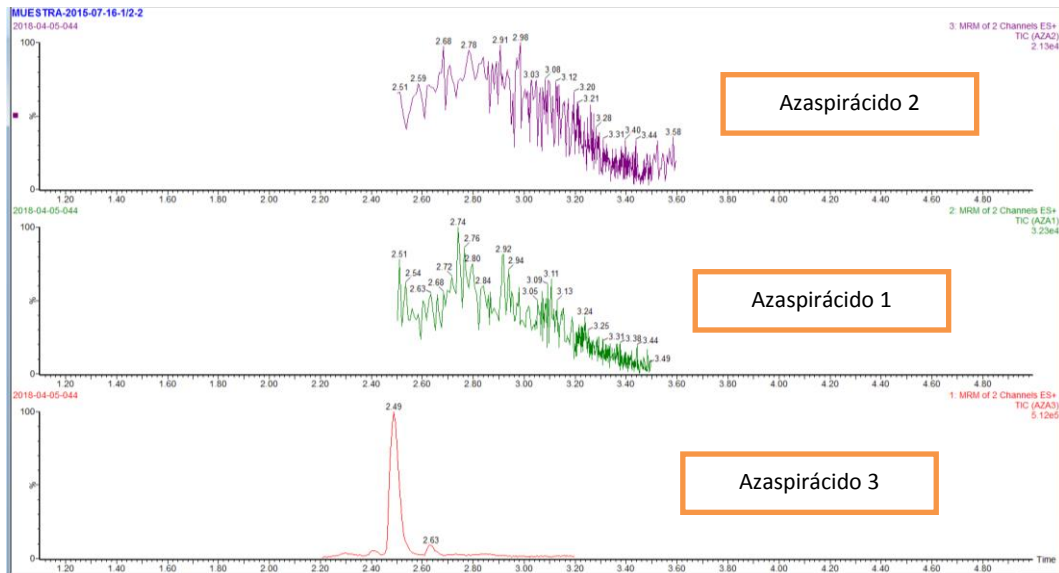
### A: Grupo del Ácido Okadaico



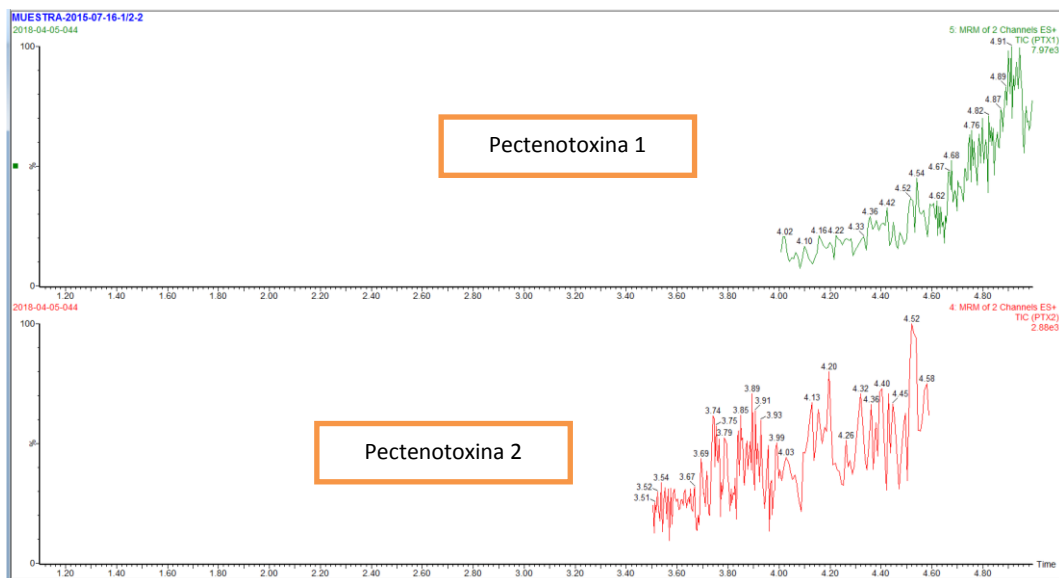
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos



### D: Grupo de las Pectenotoxinas

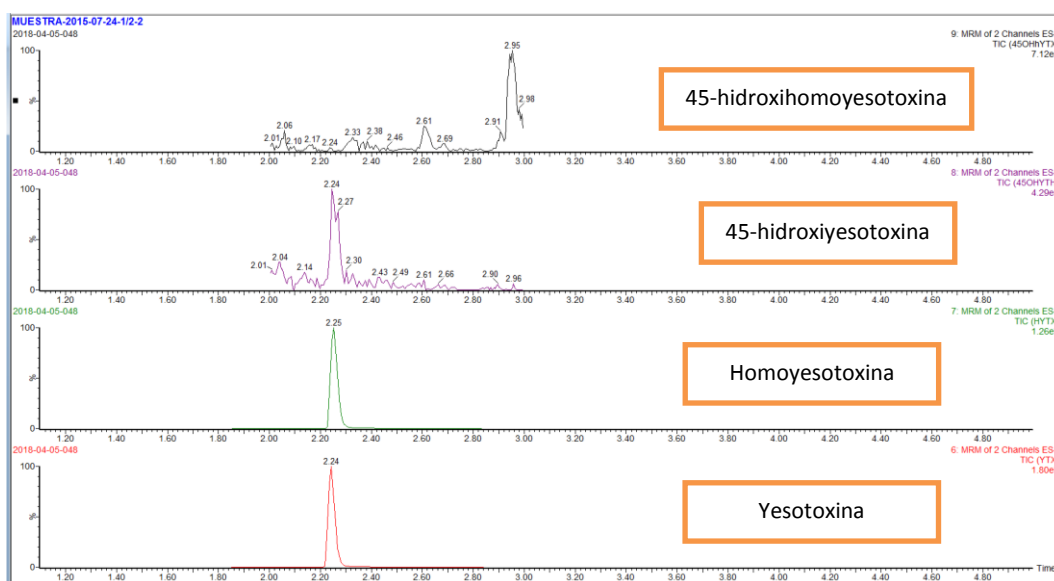


## Anexo 46. Cromatogramas muestra 2015-07-24

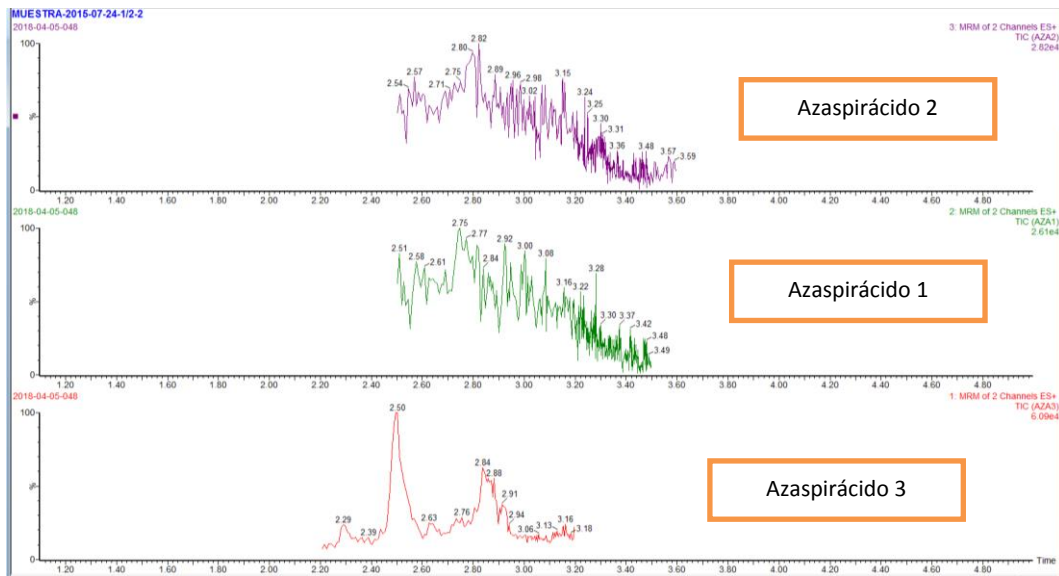
### A: Grupo del Ácido Okadaico



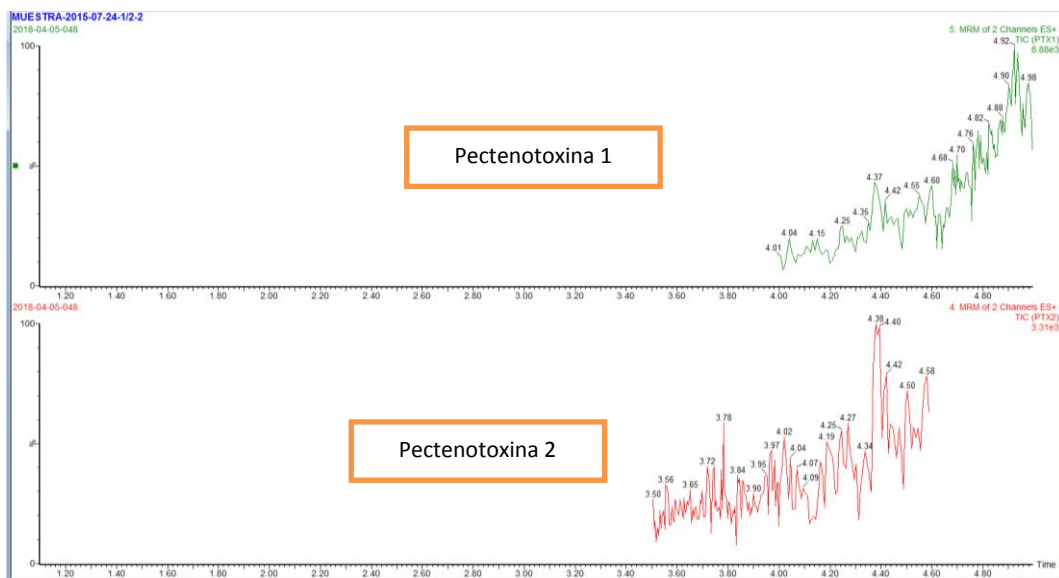
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

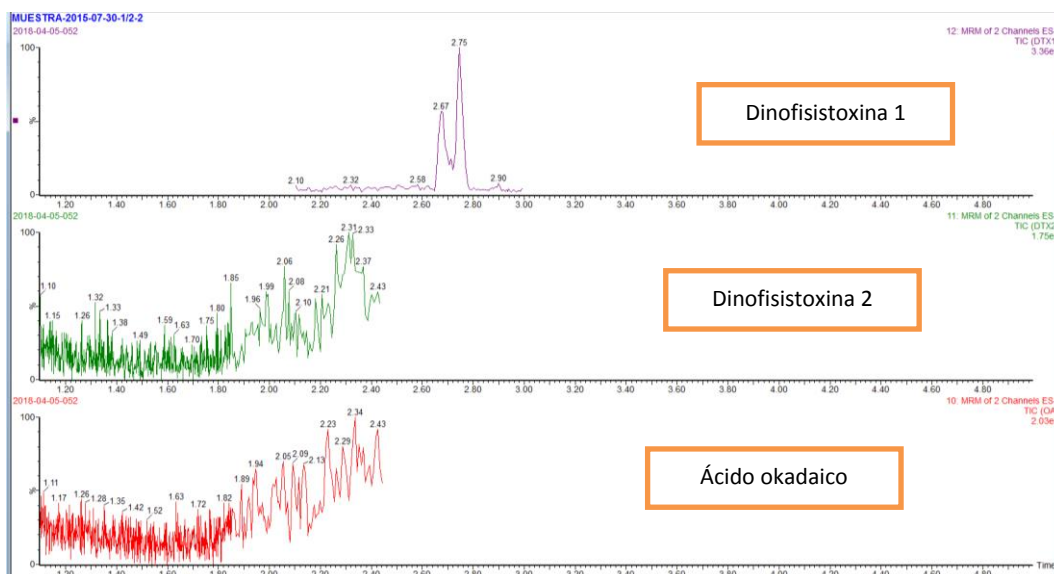


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

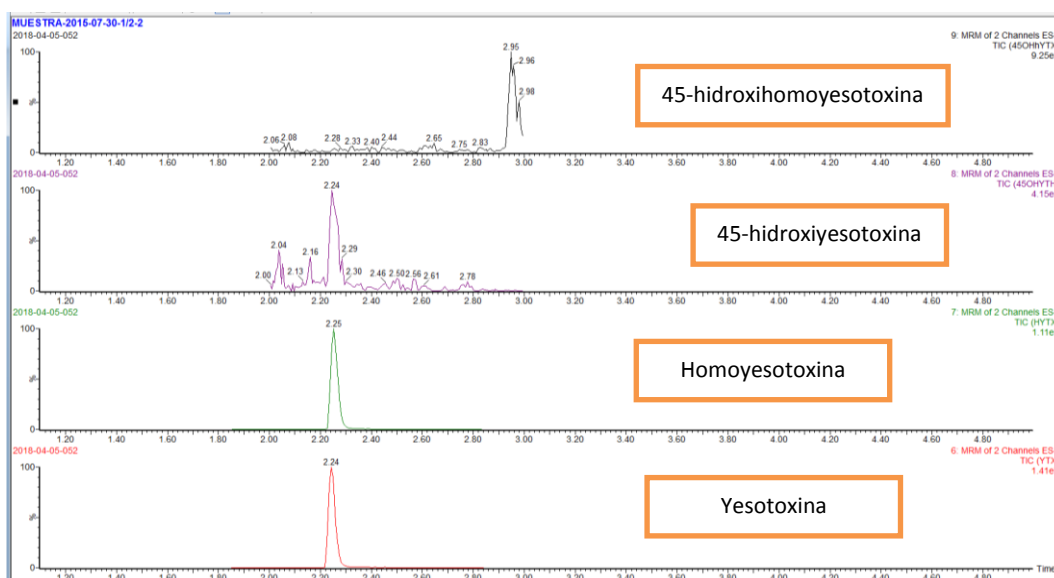


## Anexo 47. Cromatogramas muestra 2015-07-30

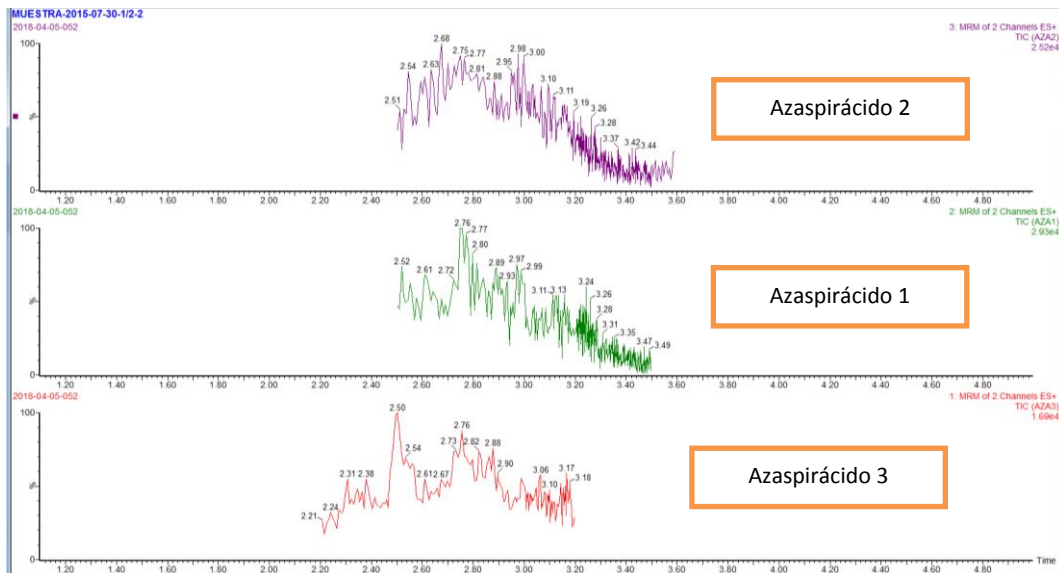
### A: Grupo del Ácido Okadaico



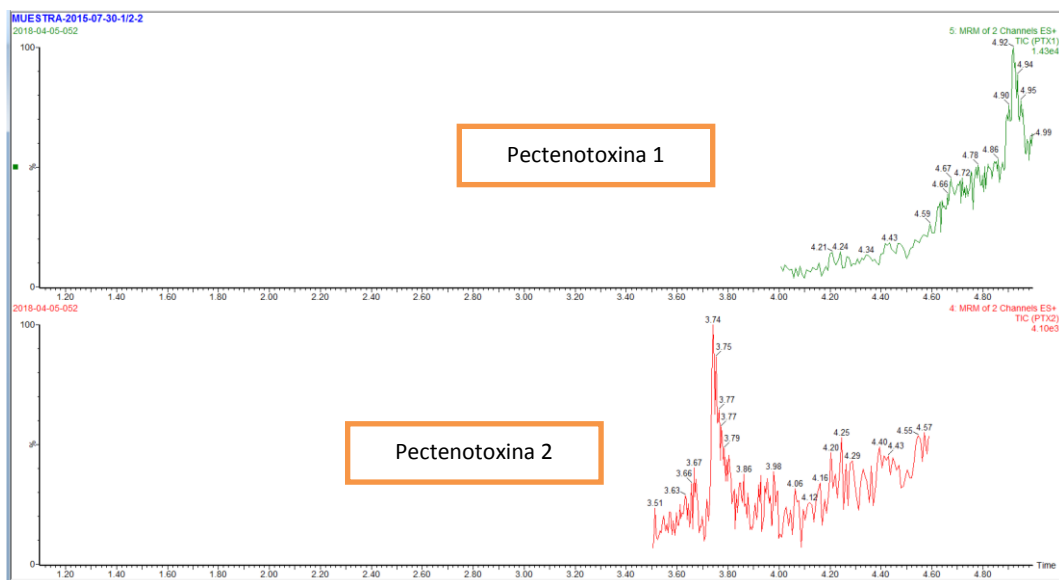
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

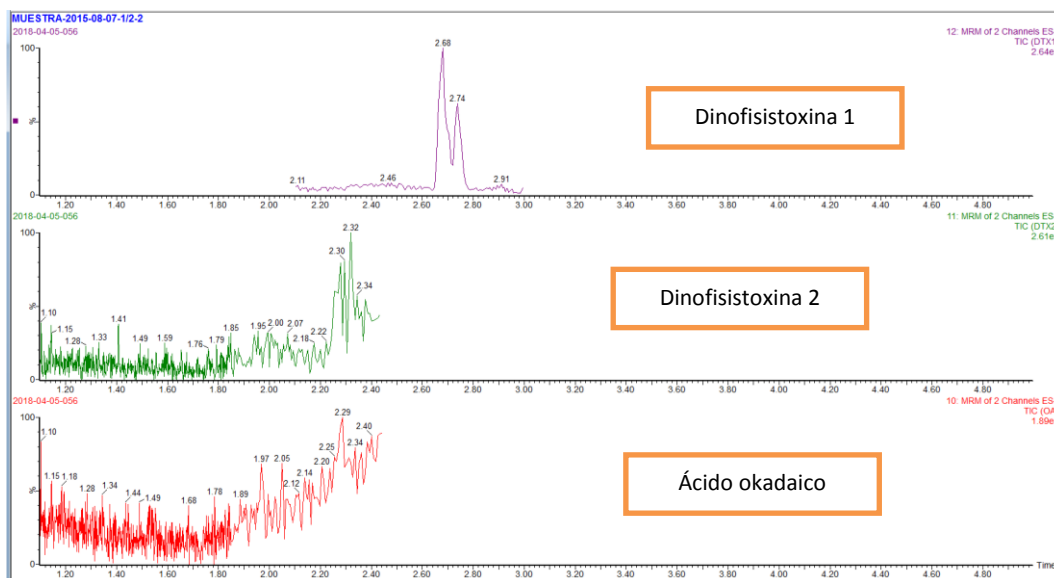


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

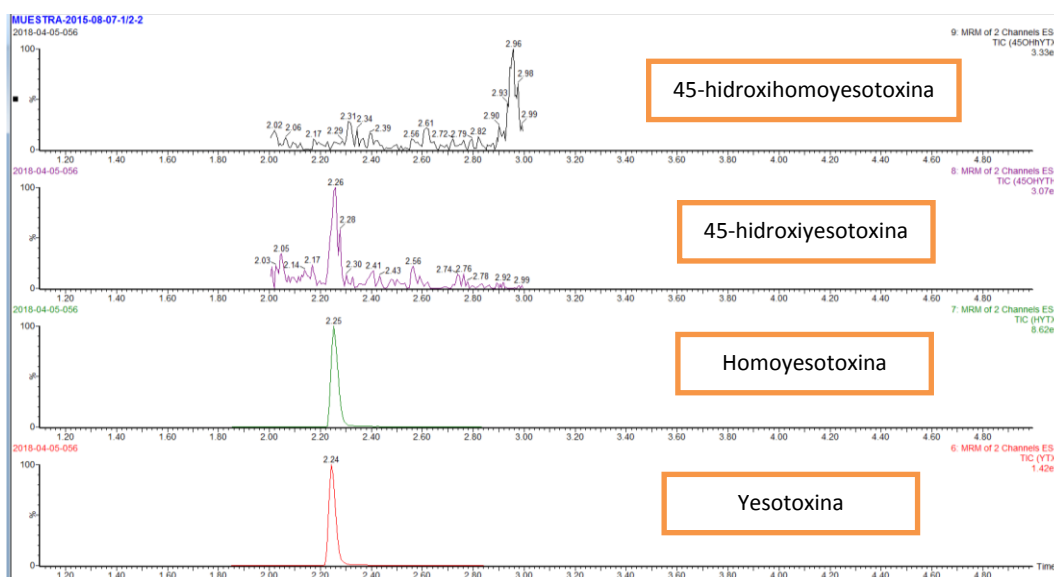


## Anexo 48. Cromatogramas muestra 2015-08-07

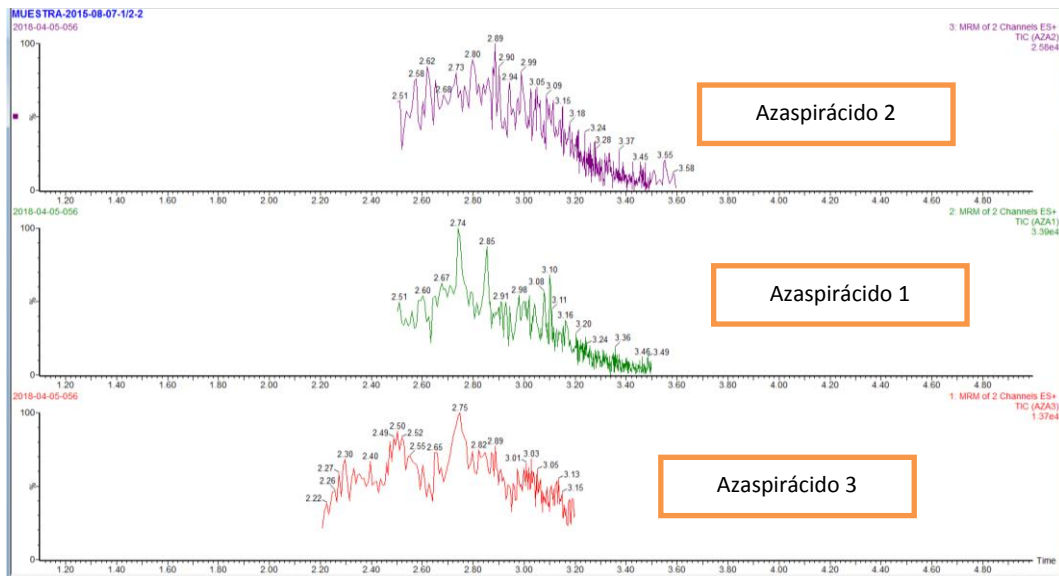
### A: Grupo del Ácido Okadaico



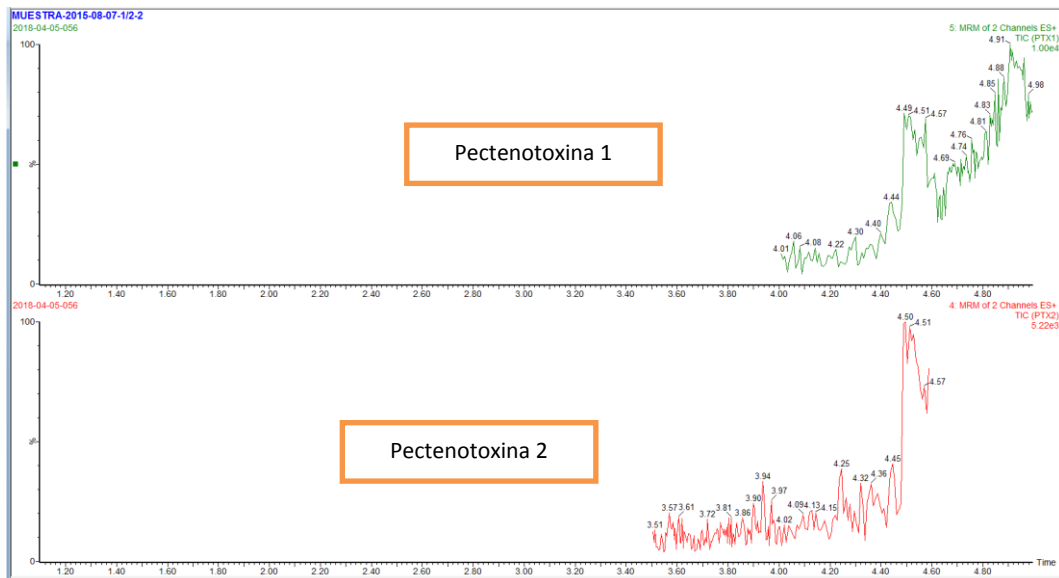
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

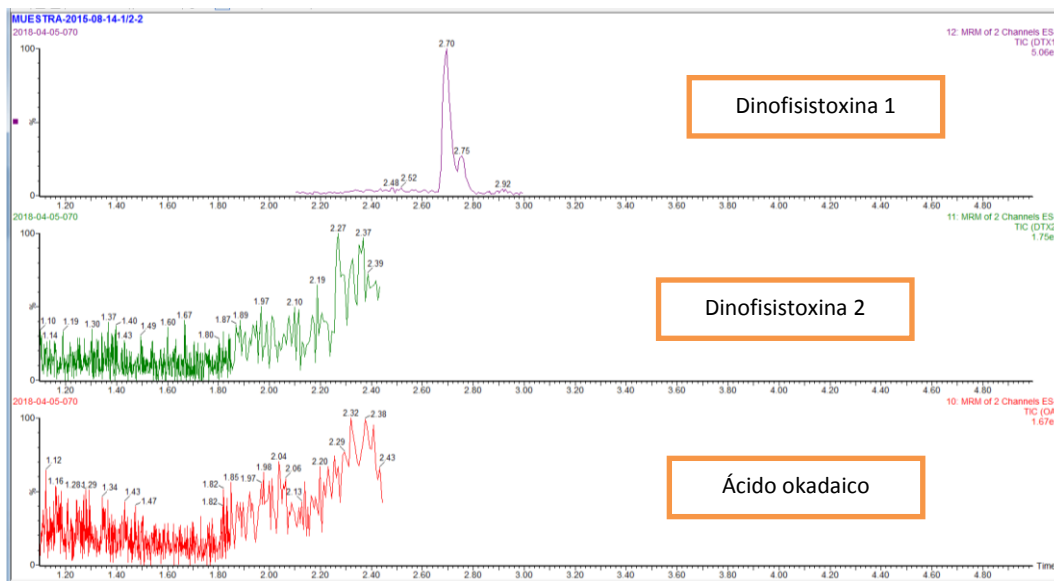


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

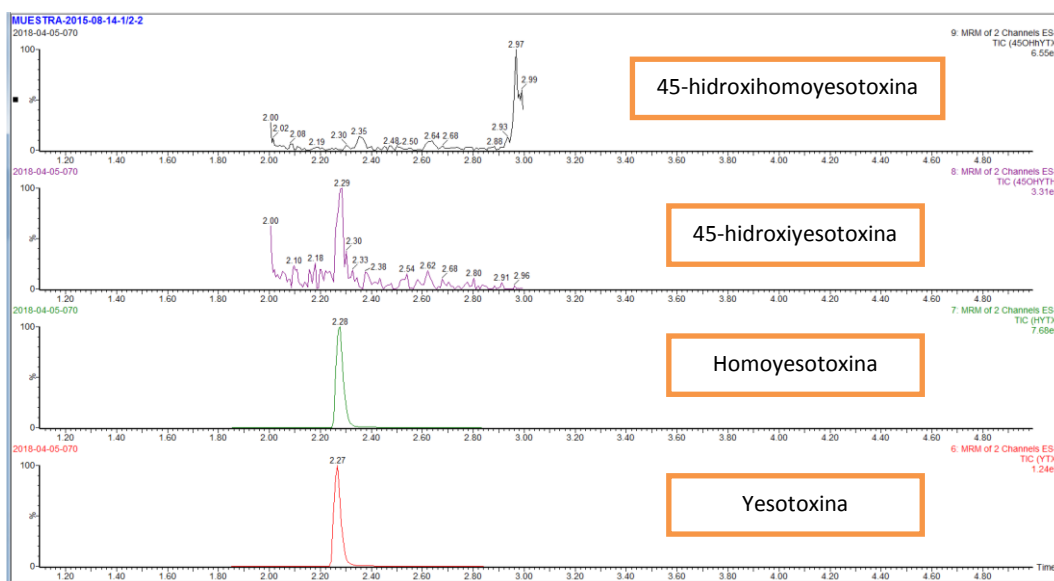


## Anexo 49. Cromatogramas muestra 2015-08-14

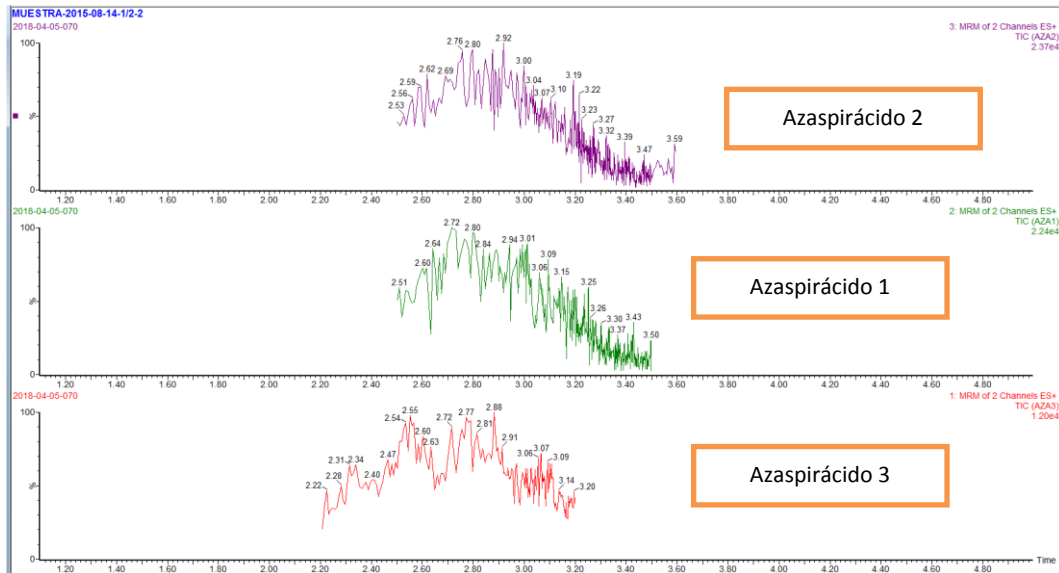
### A: Grupo del Ácido Okadaico



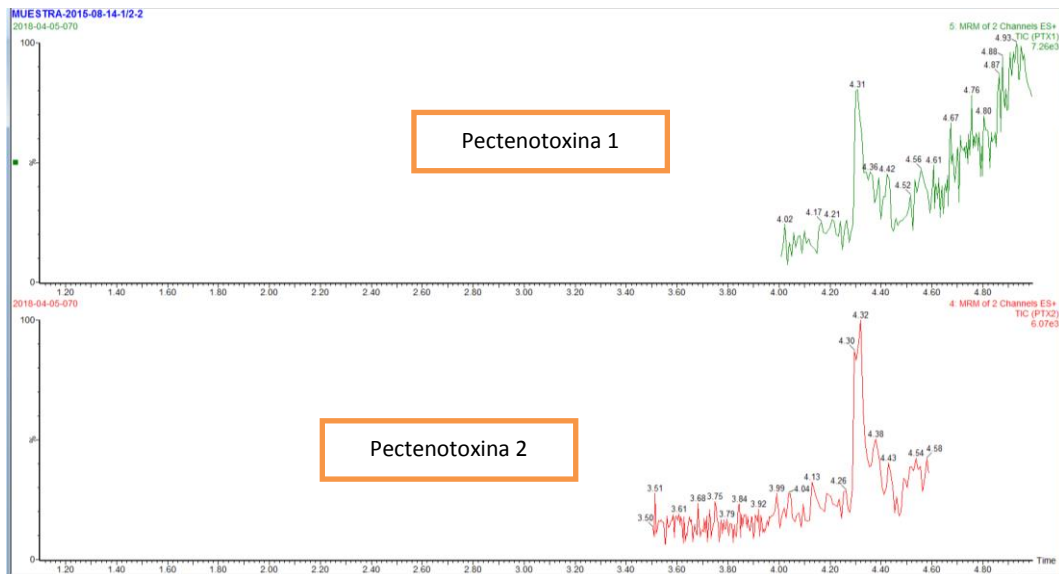
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

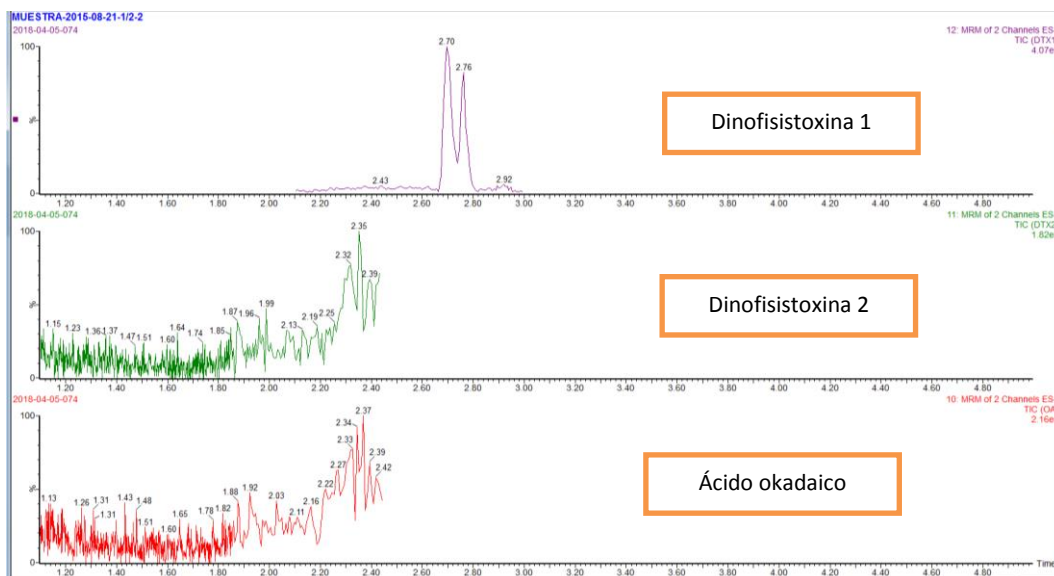


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

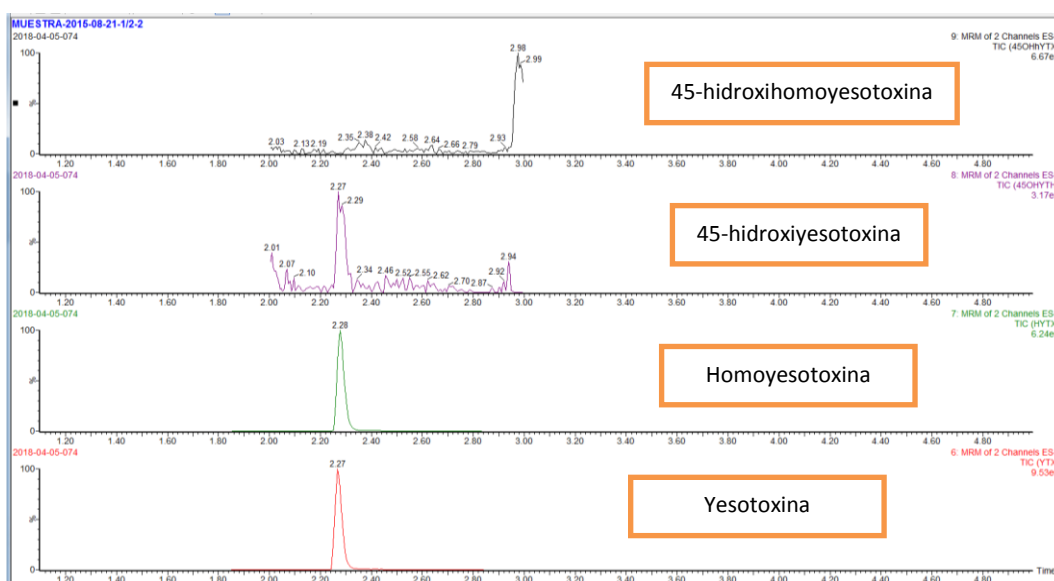


## Anexo 50. Cromatogramas muestra 2015-08-21

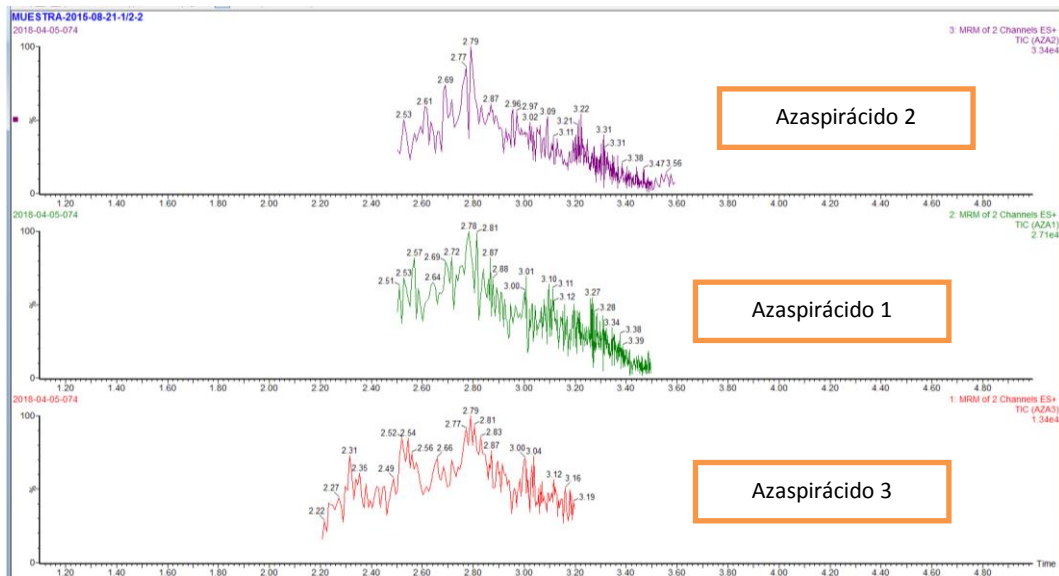
### A: Grupo del Ácido Okadaico



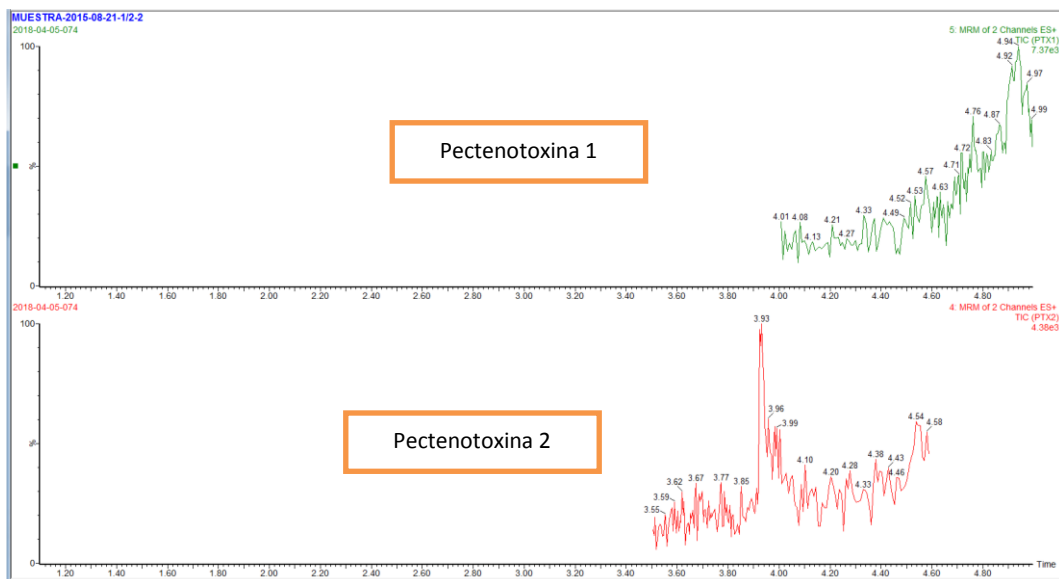
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

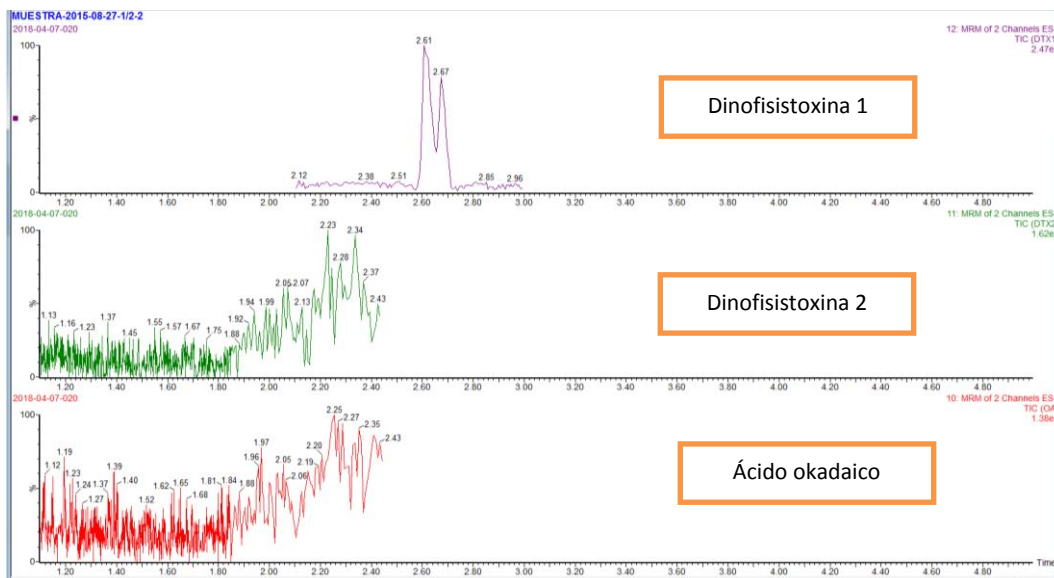


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

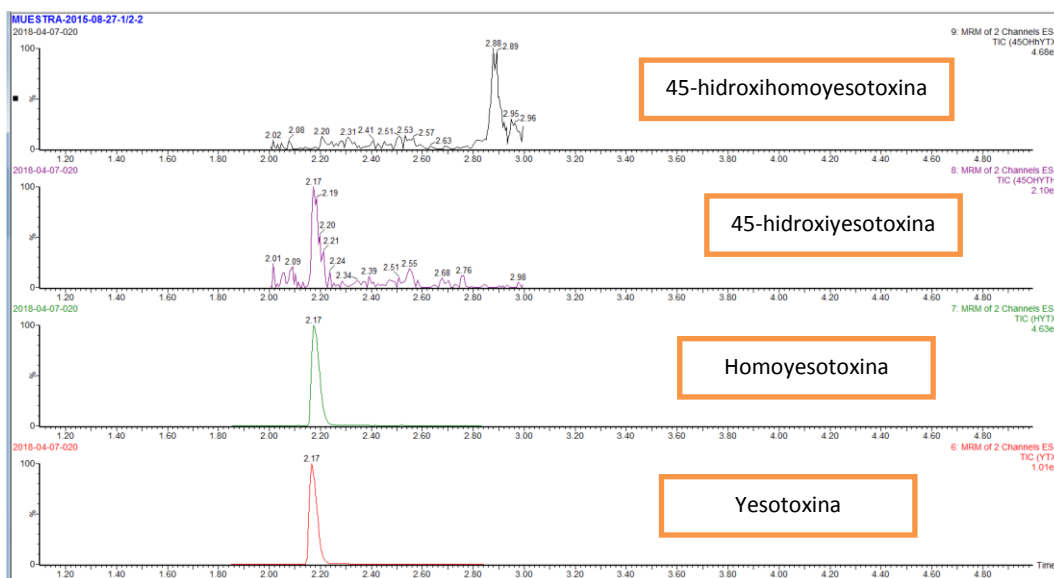


## Anexo 51. Cromatogramas muestra 2015-08-27

### A: Grupo del Ácido Okadaico



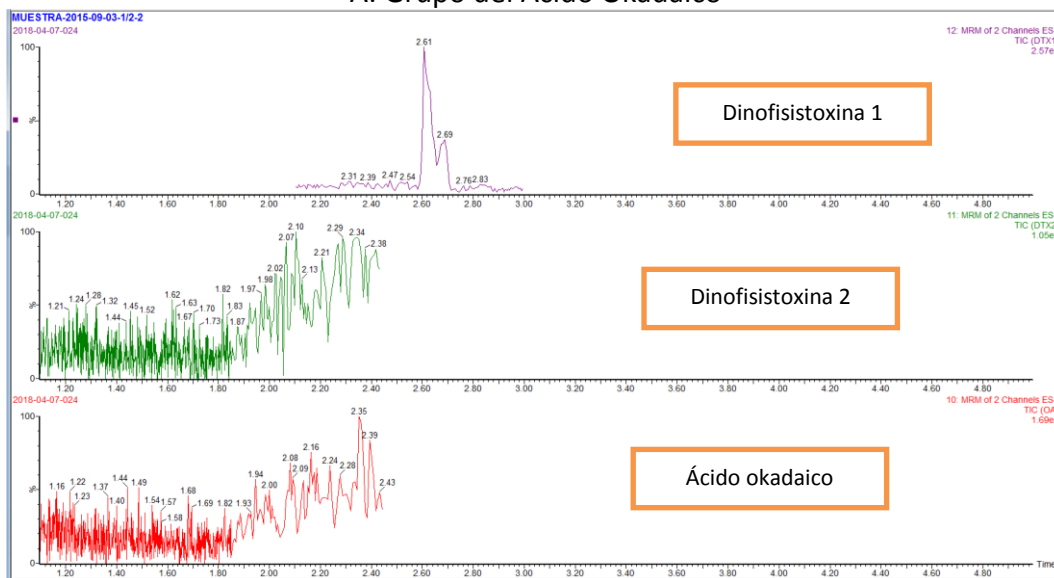
### B: Grupo de las Yesotoxinas



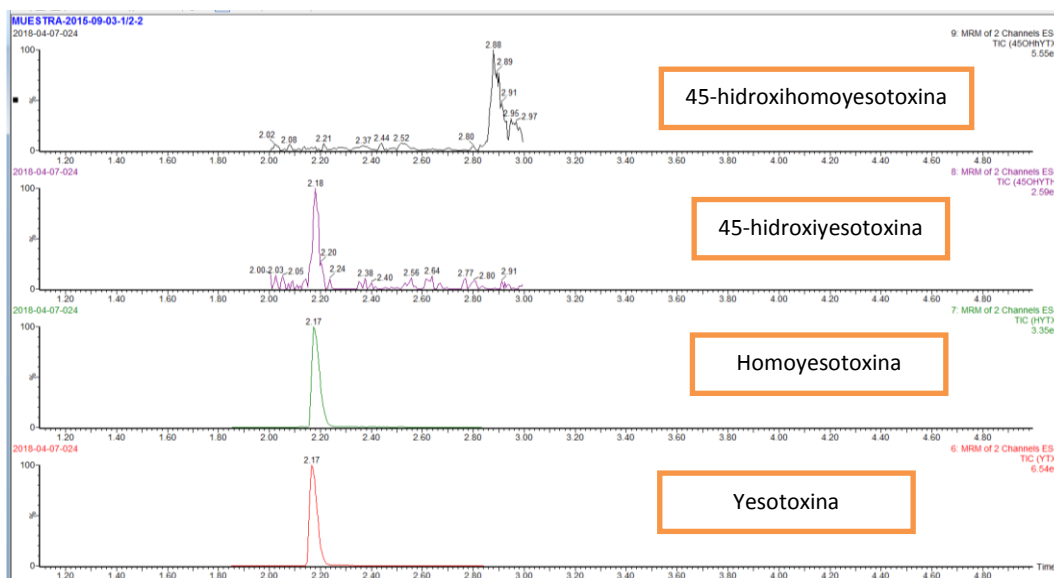


## Anexo 52. Cromatogramas muestra 2015-09-03

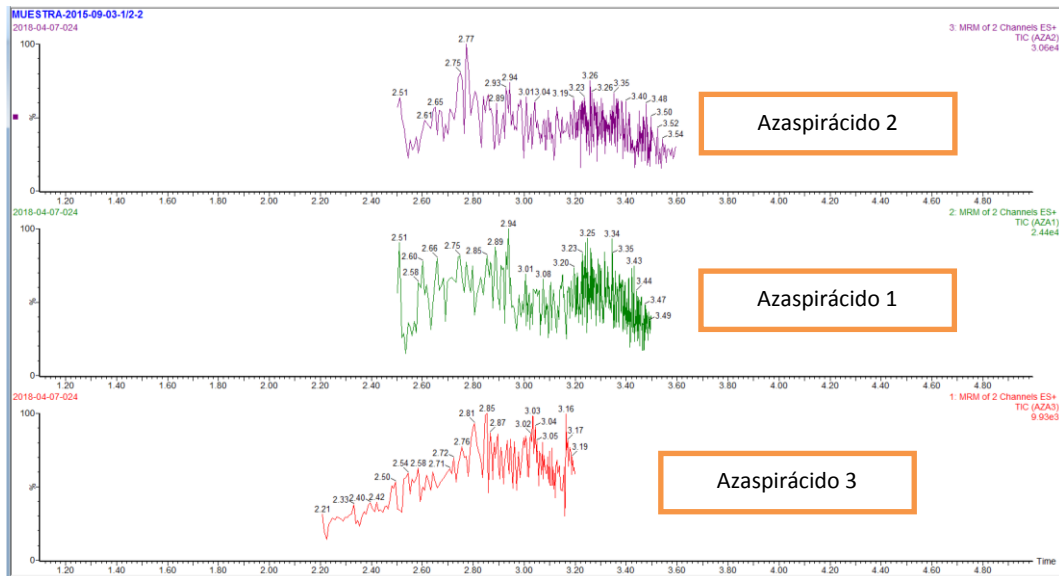
### A: Grupo del Ácido Okadaico



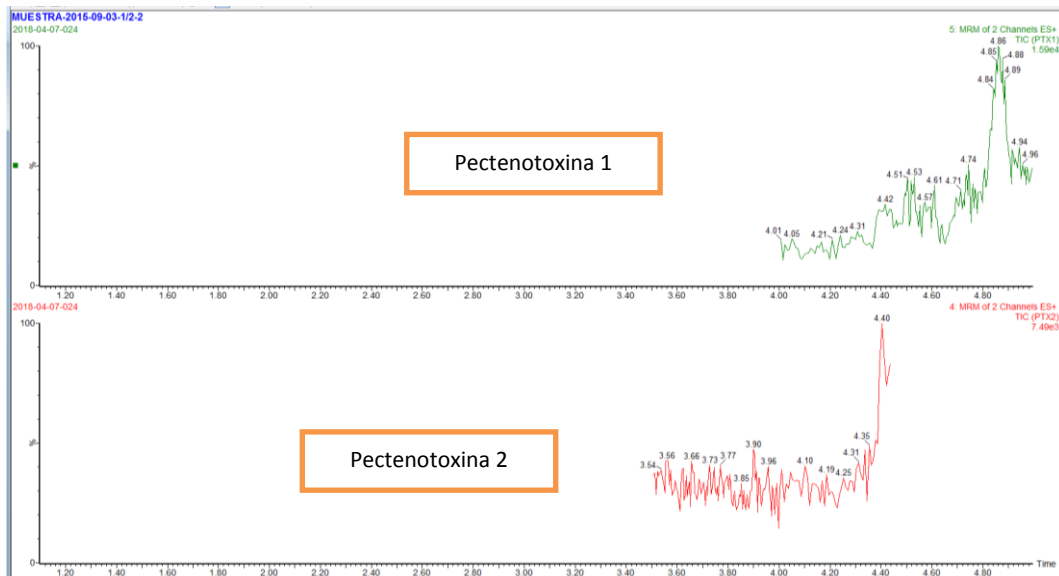
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

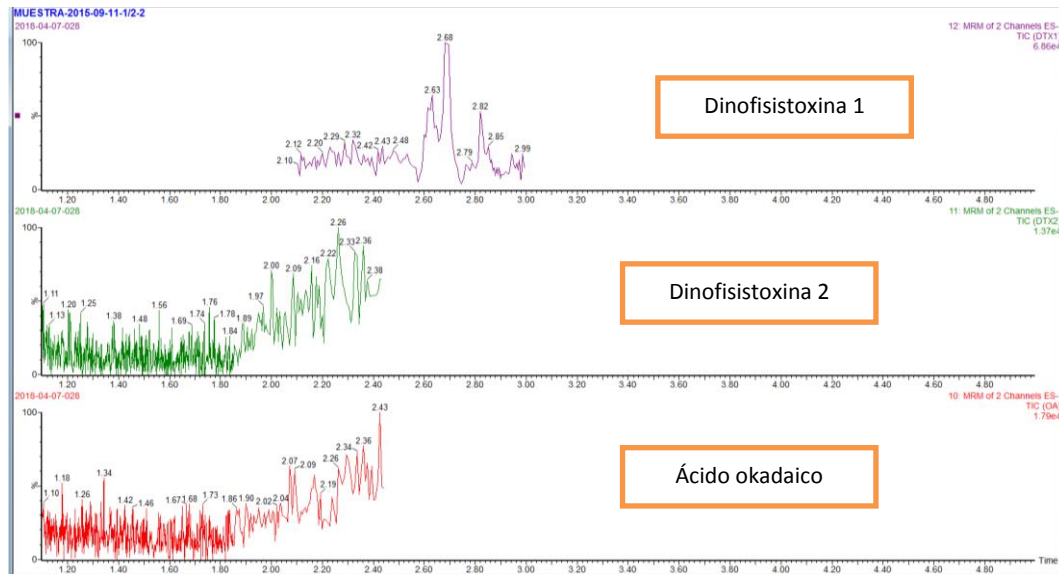


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

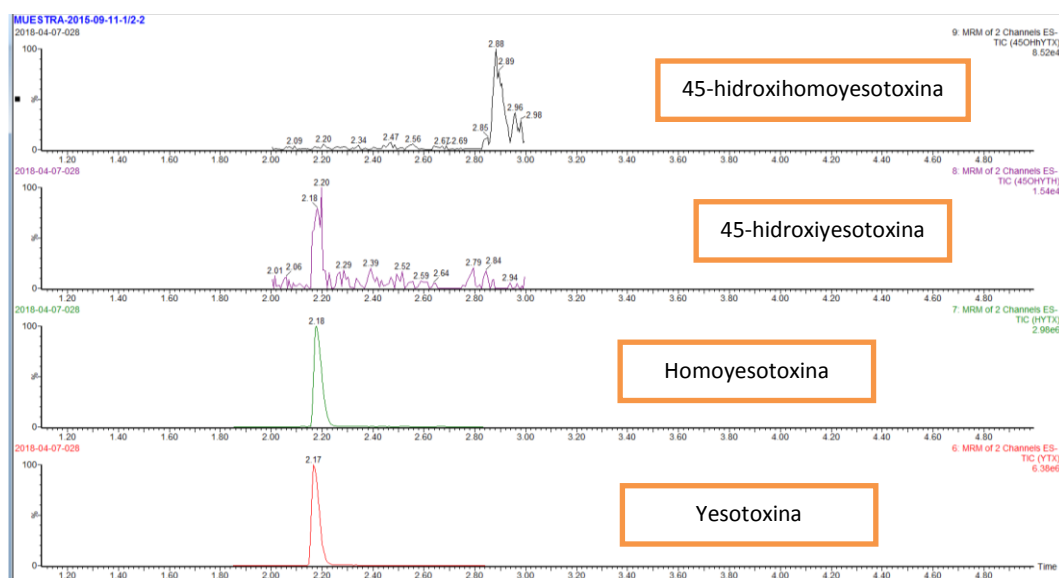


## Anexo 53. Cromatogramas muestra 2015-09-11

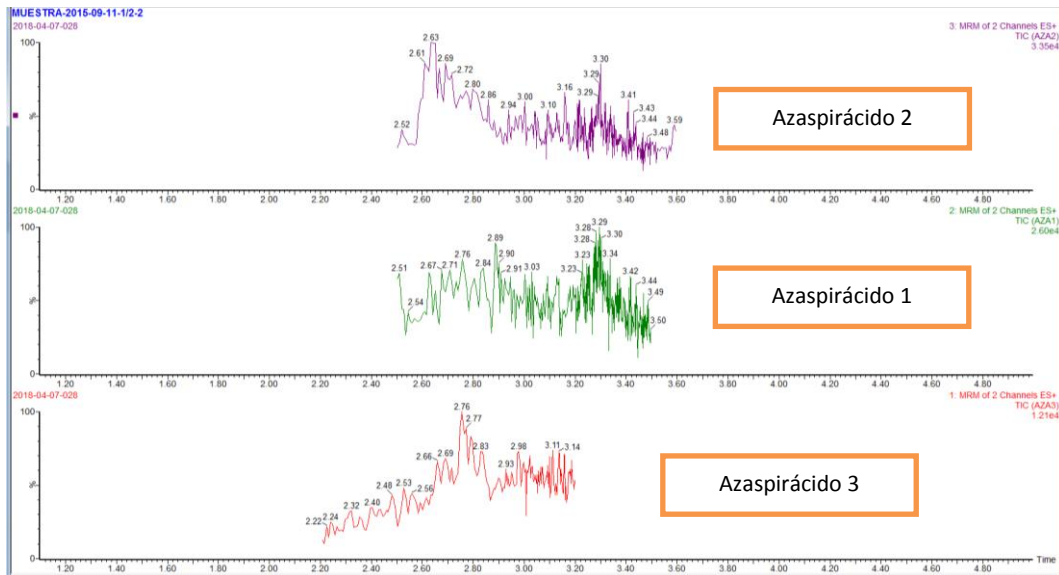
### A: Grupo del Ácido Okadaico



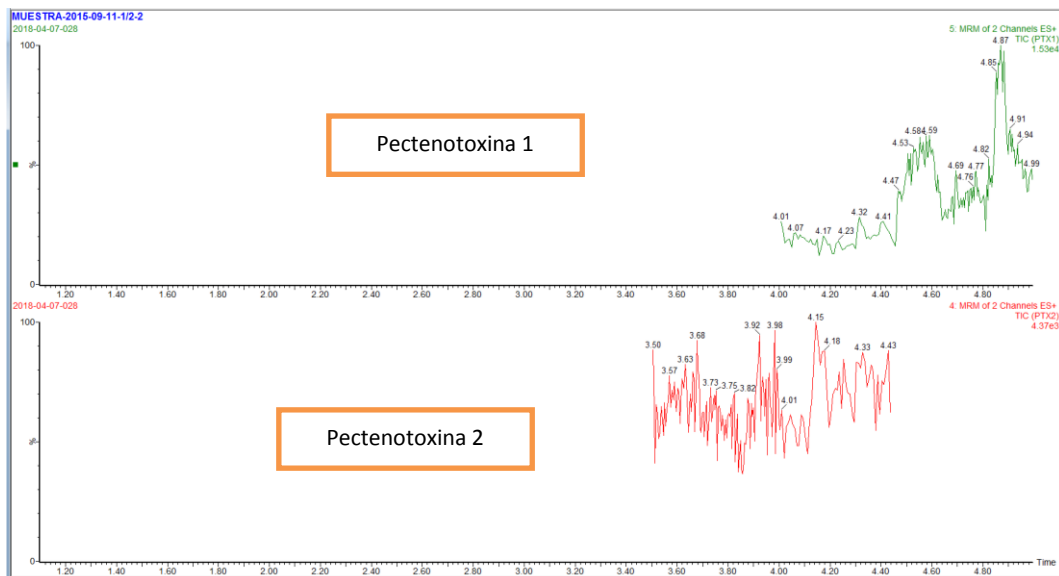
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

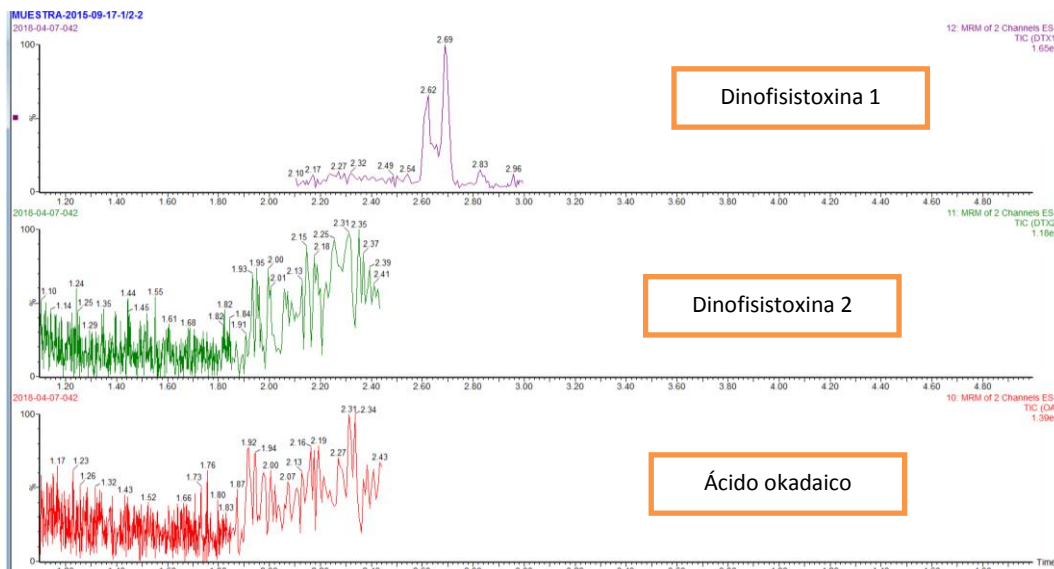


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

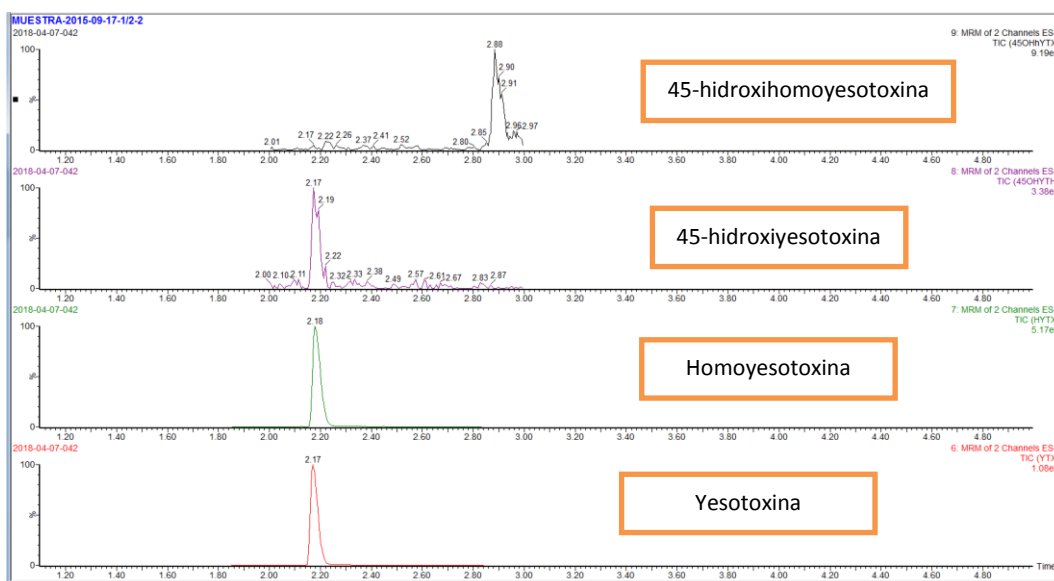


## Anexo 54. Cromatogramas muestra 2015-09-17

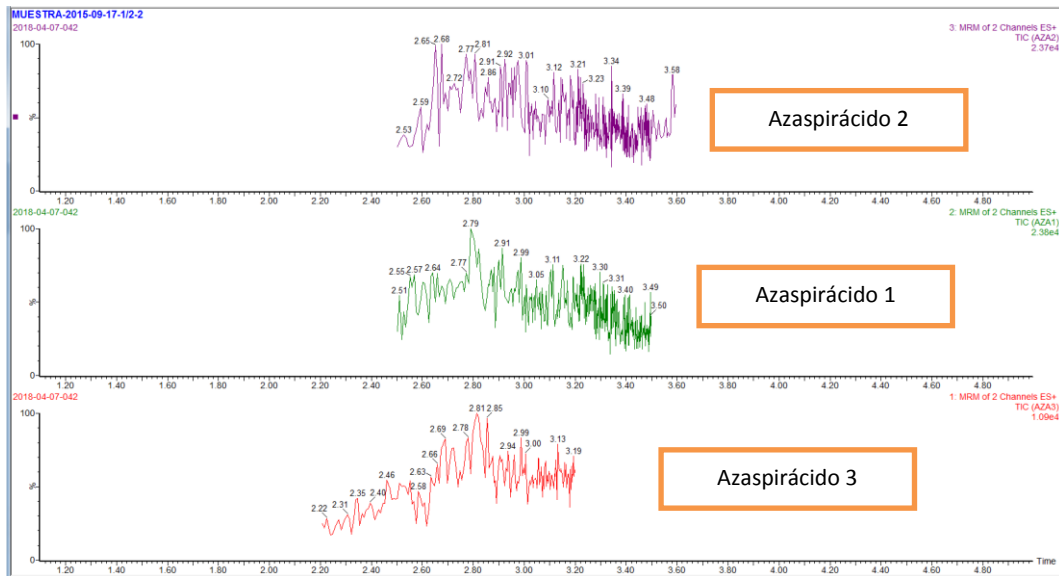
### A: Grupo del Ácido Okadaico



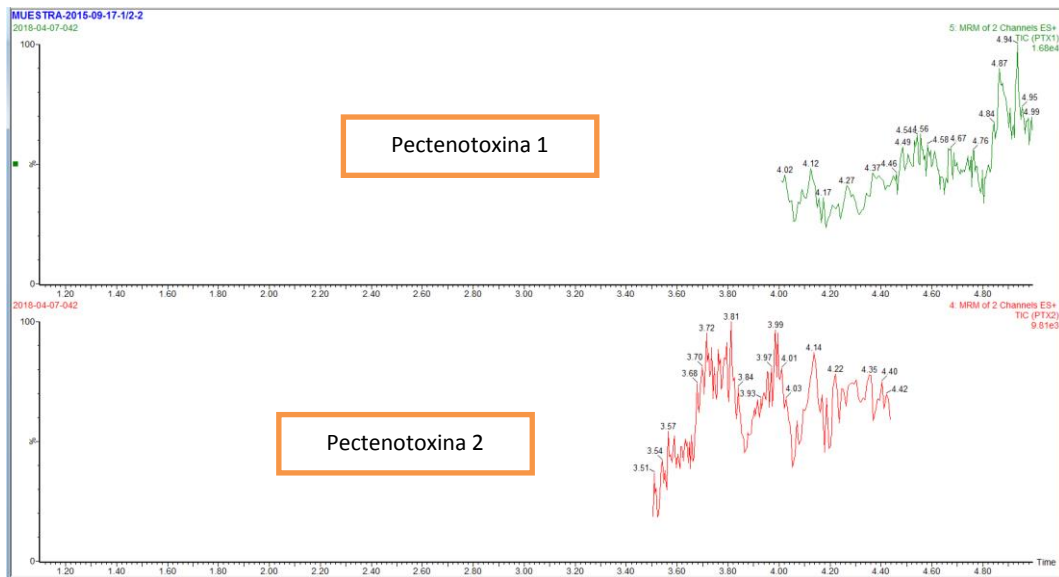
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

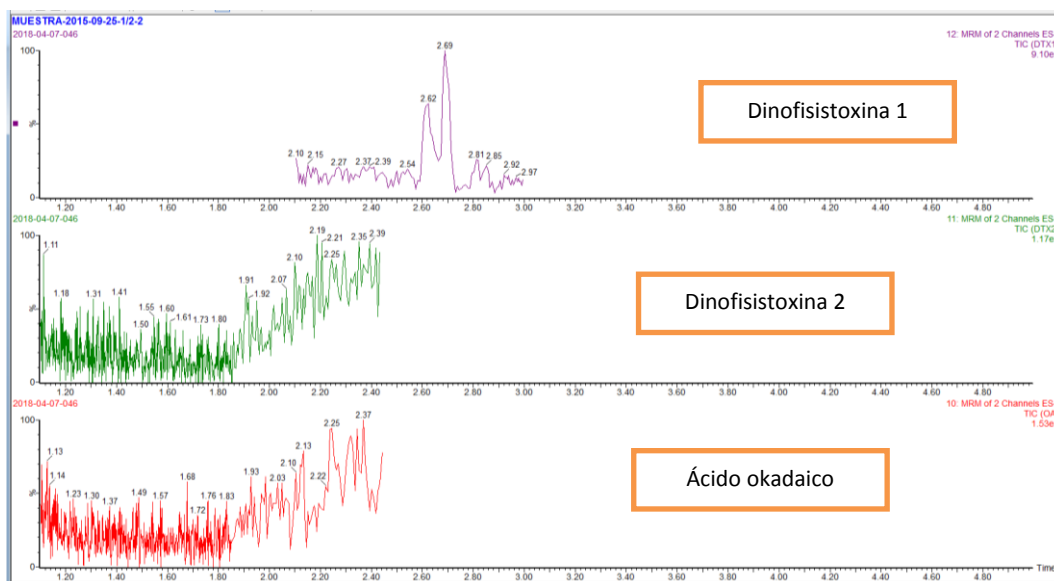


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

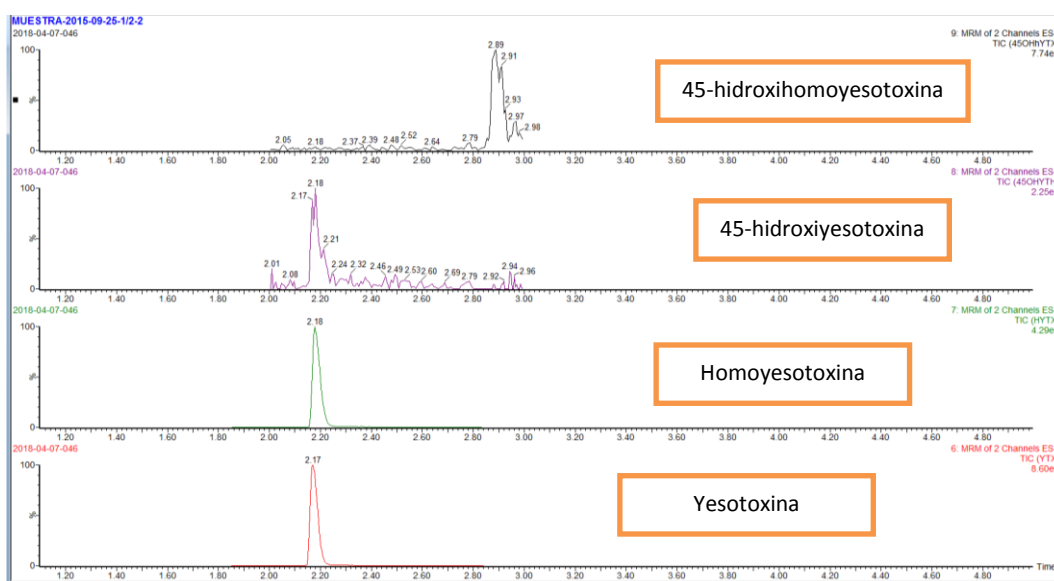


## Anexo 55. Cromatogramas muestra 2015-09-25

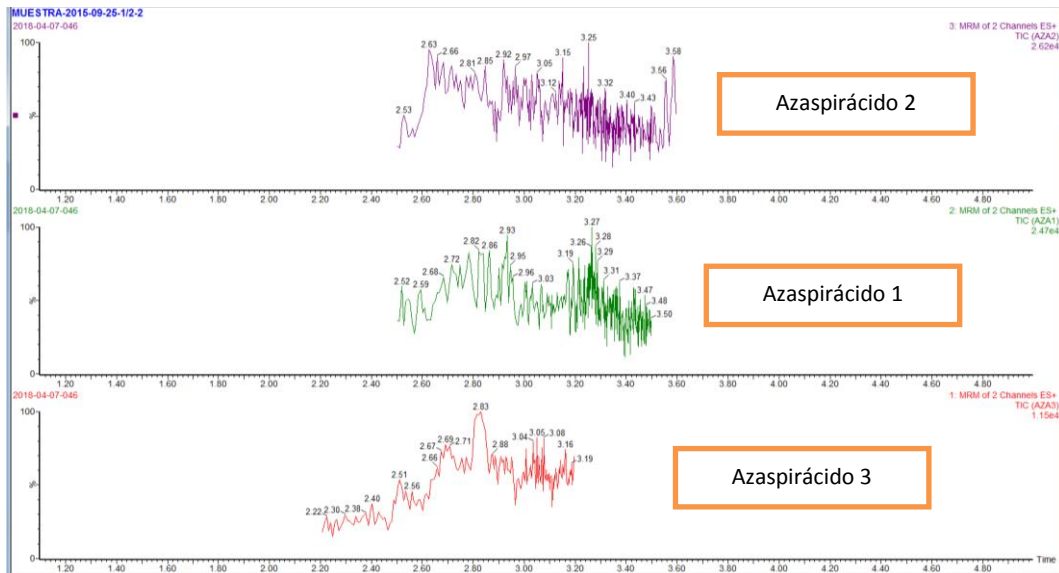
### A: Grupo del Ácido Okadaico



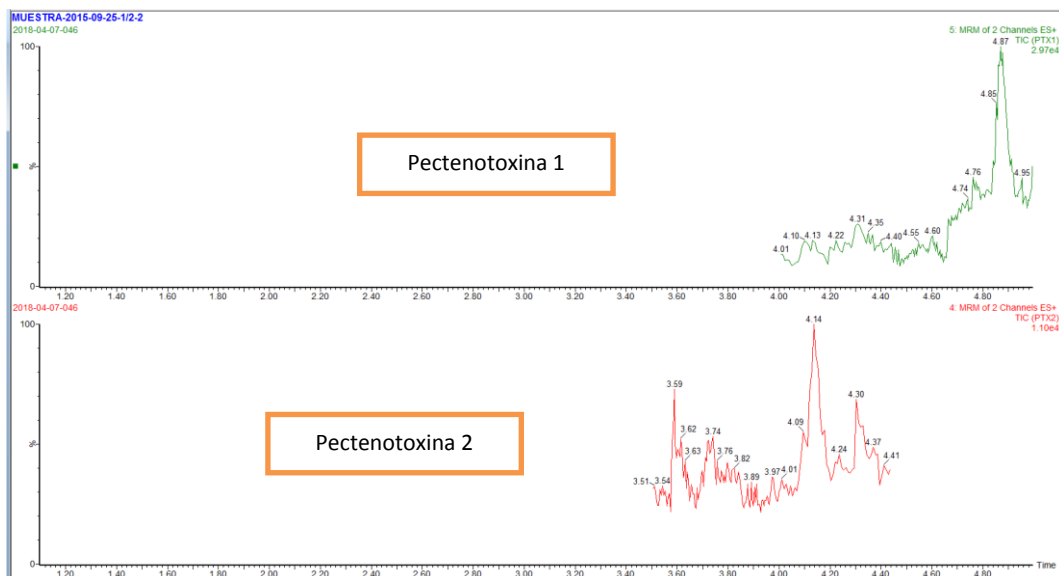
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

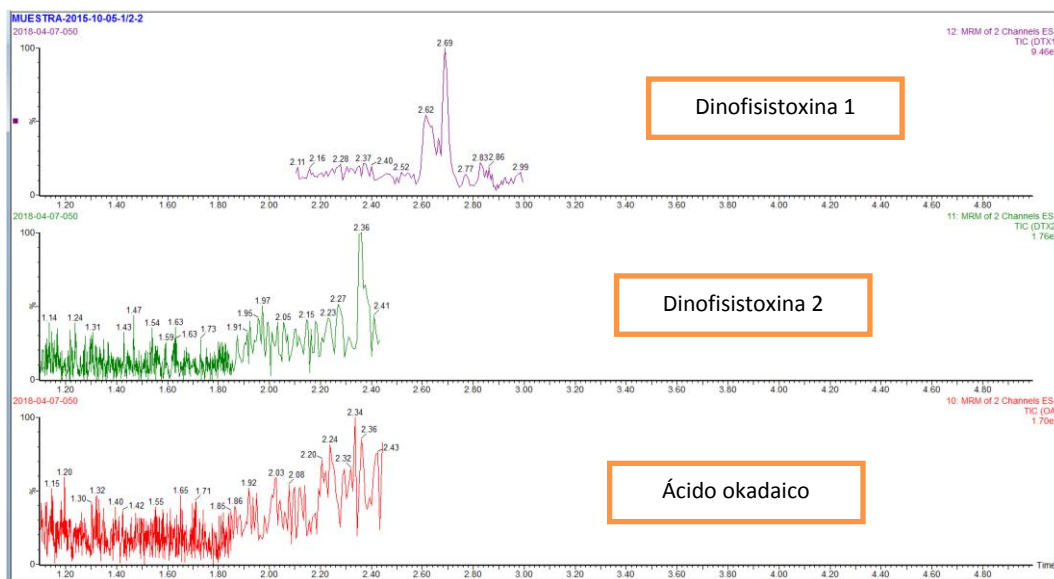


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

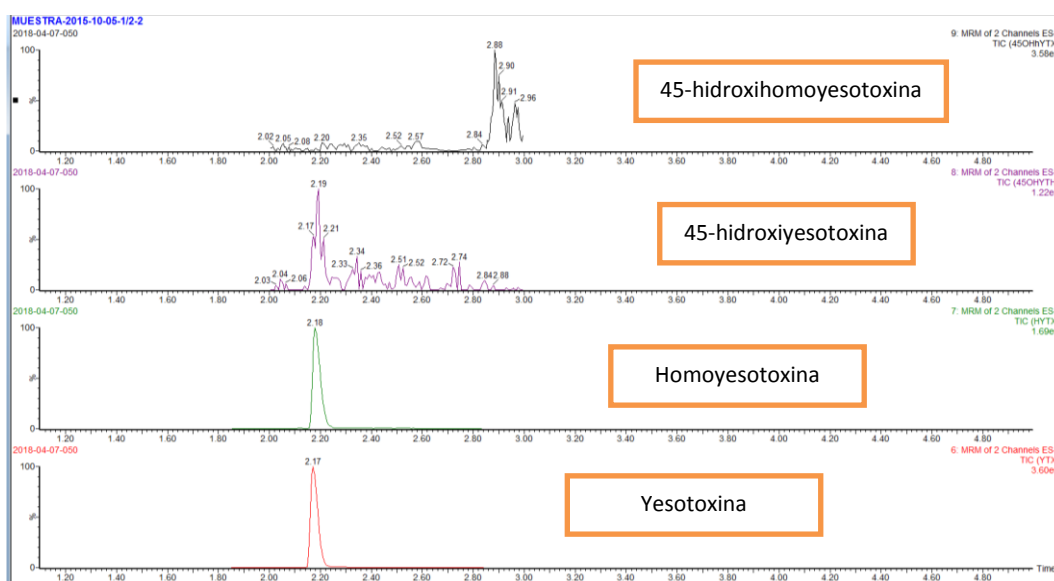


## Anexo 56. Cromatogramas muestra 2015-10-05

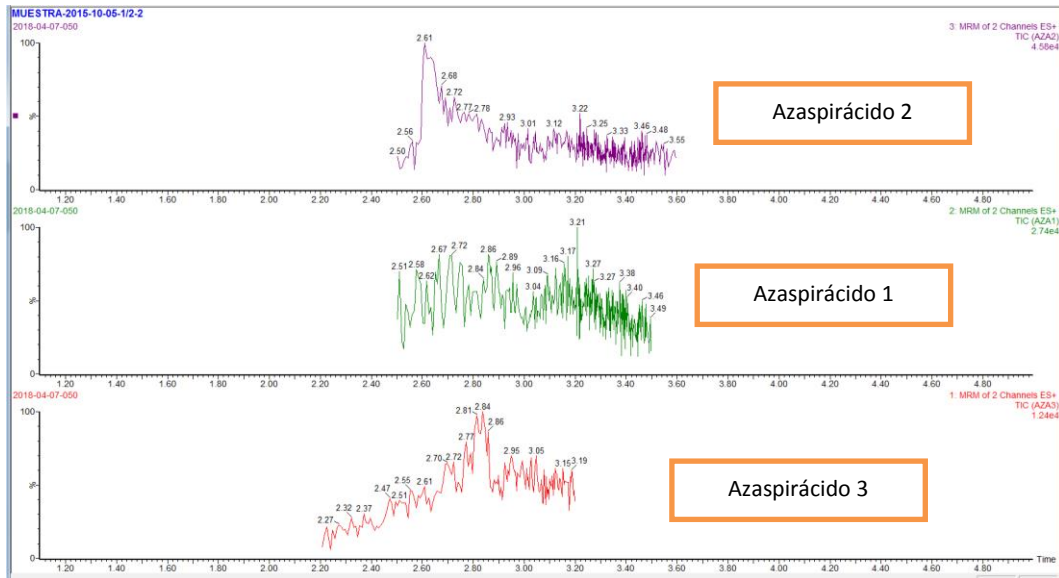
### A: Grupo del Ácido Okadaico



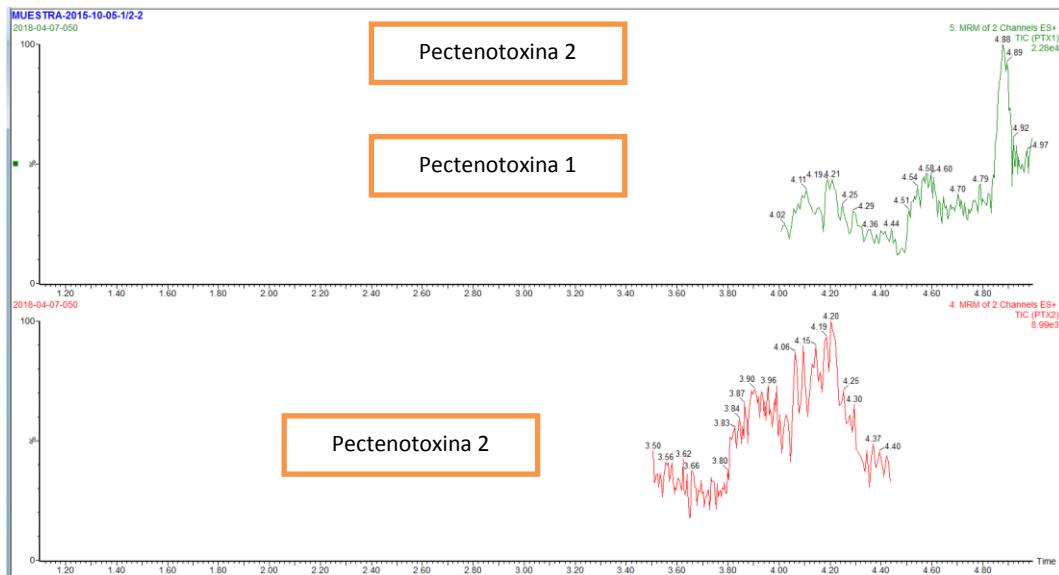
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

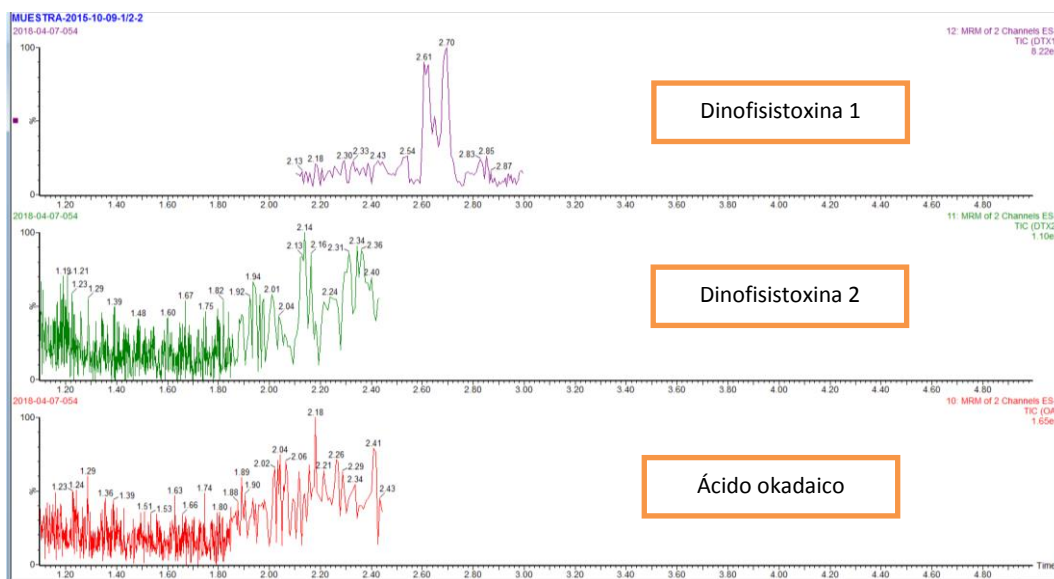


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

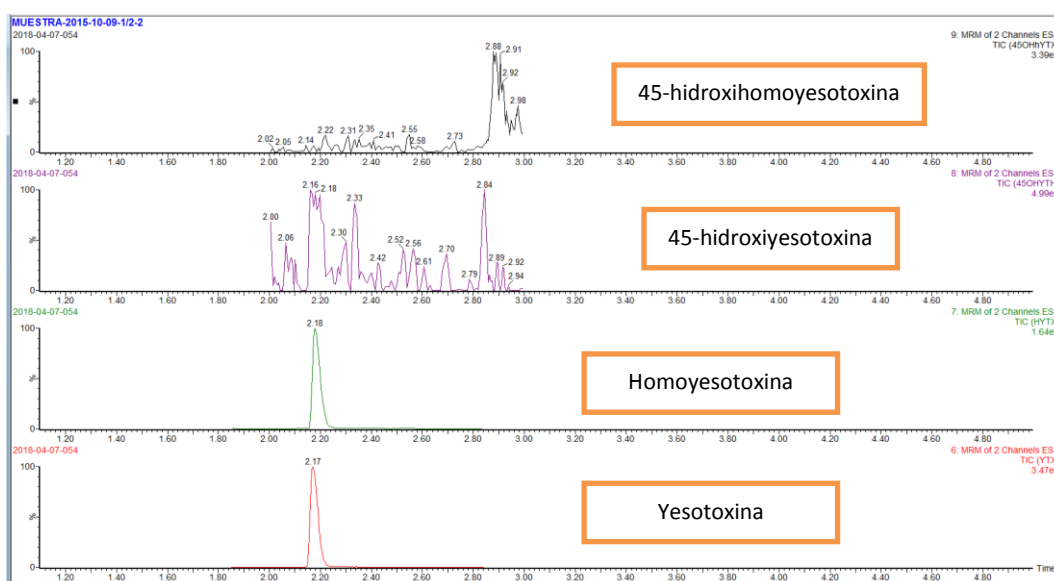


## Anexo 57. Cromatogramas muestra 2015-10-09

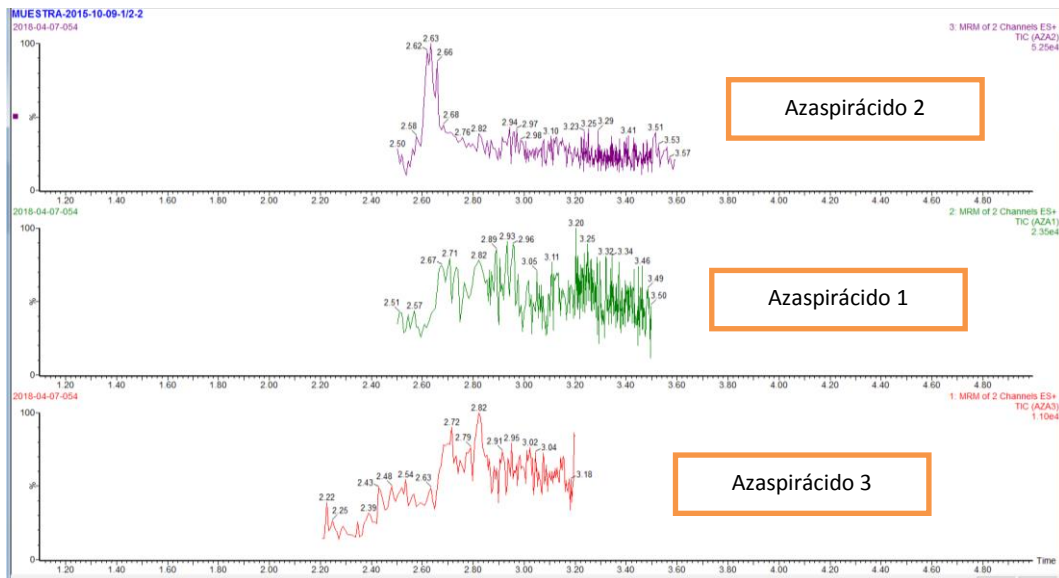
### A: Grupo del Ácido Okadaico



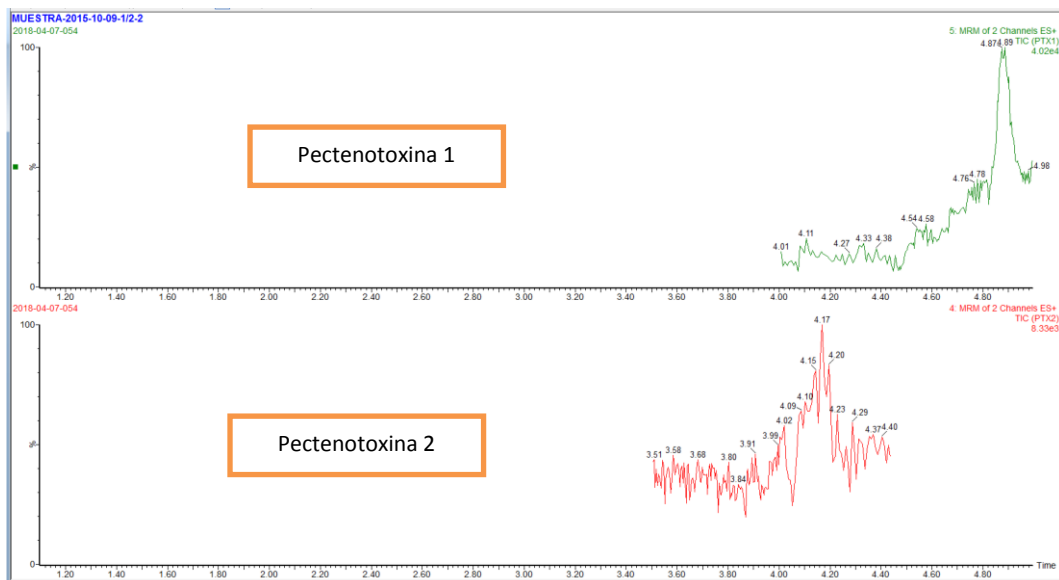
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

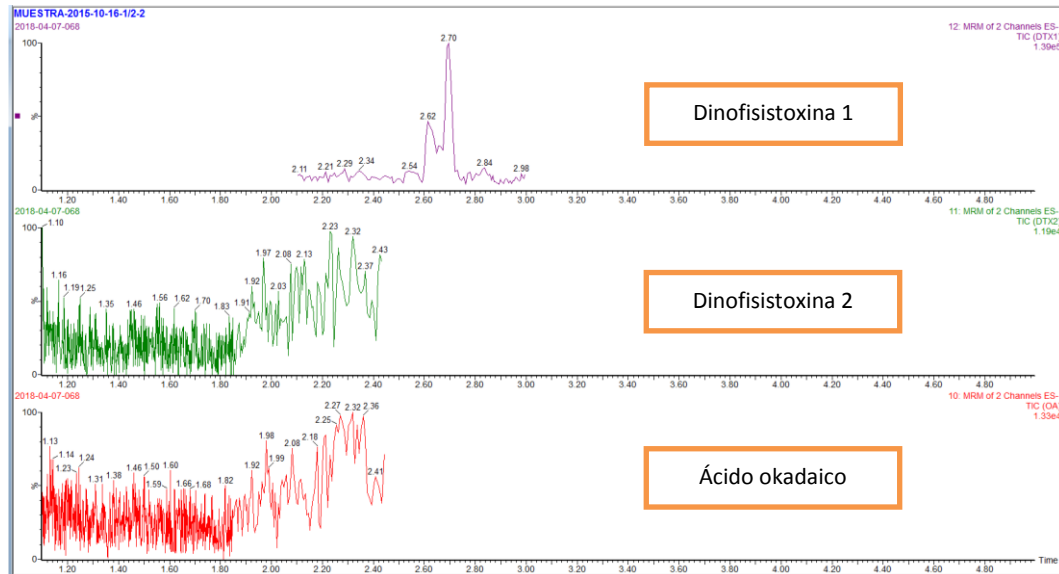


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

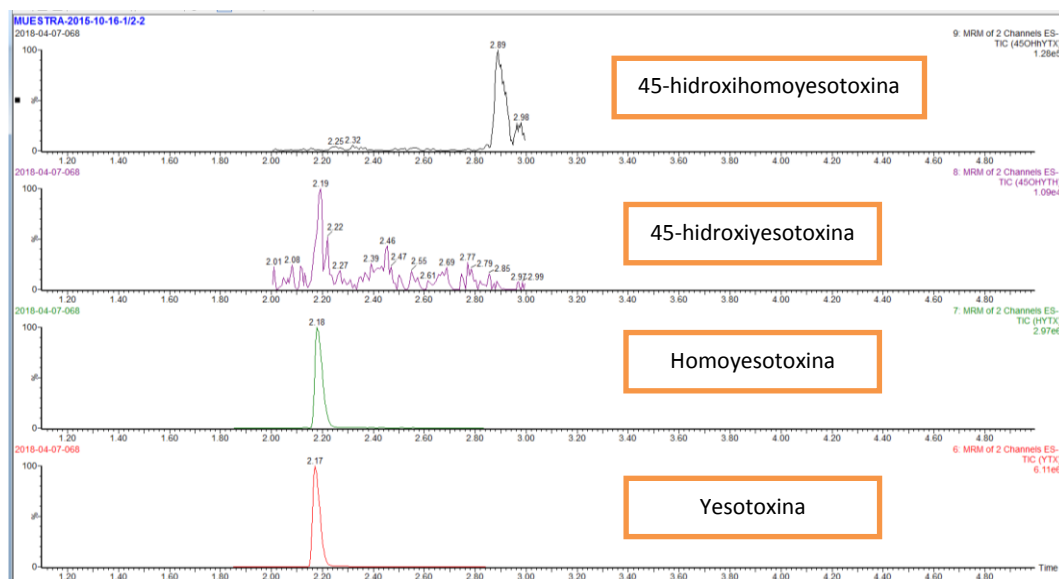


## Anexo 58. Cromatogramas muestra 2015-10-16

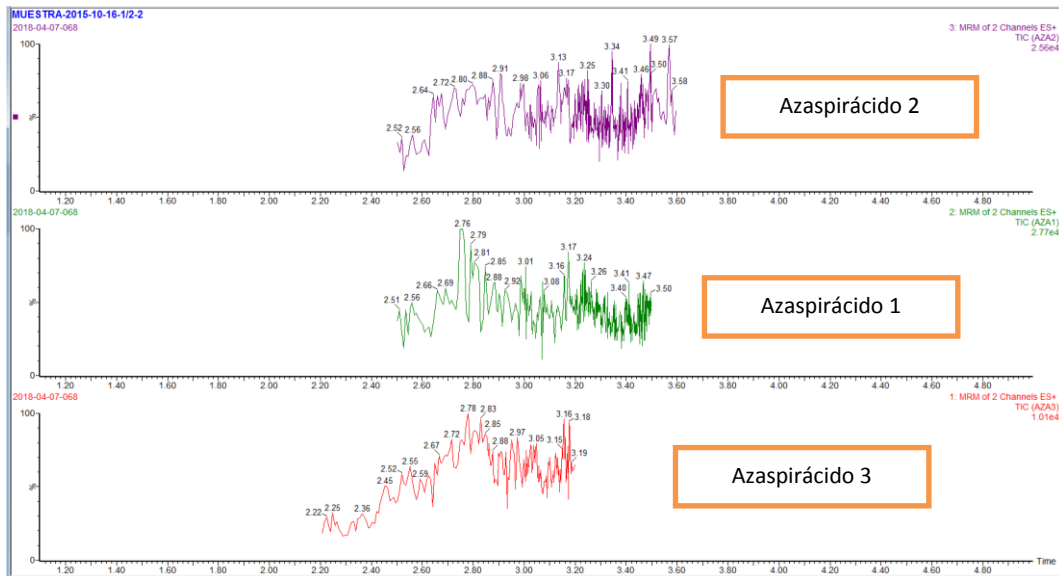
### A: Grupo del Ácido Okadaico



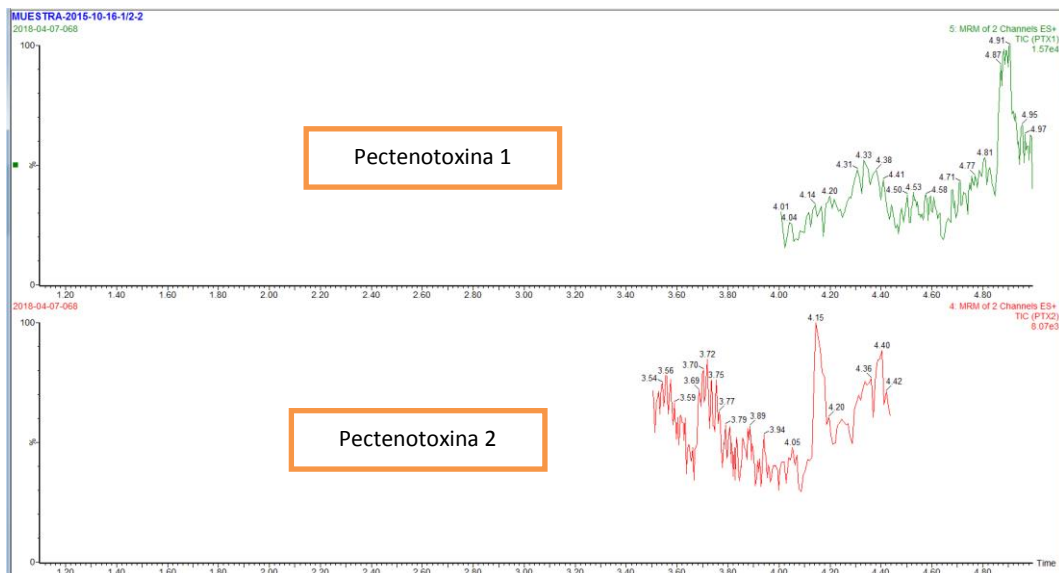
### B: Grupo de las Yesotoxinas



### C: Grupo de los Azaspirácidos

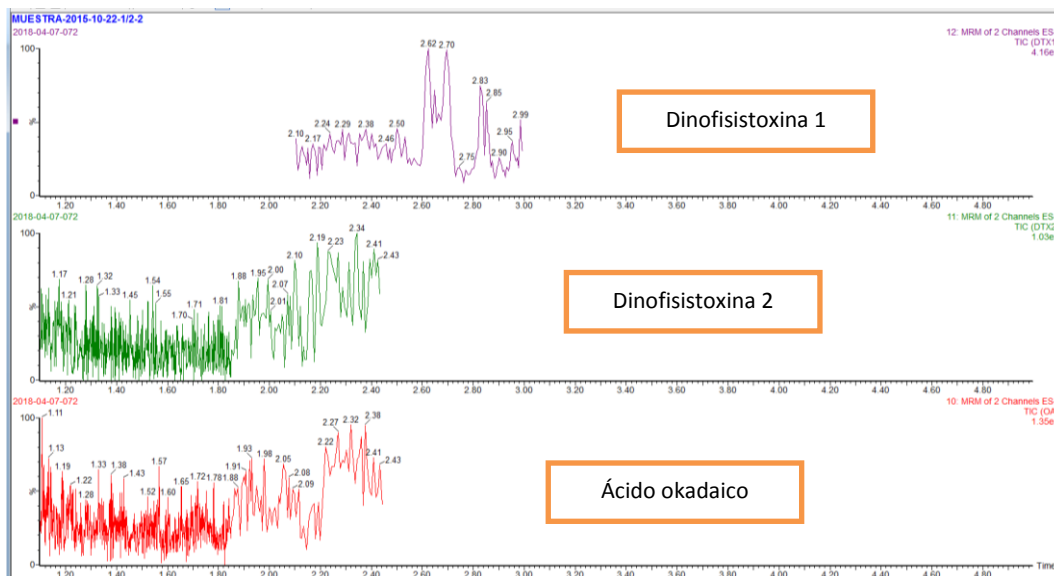


### D: Grupo de las Pectenotoxinas

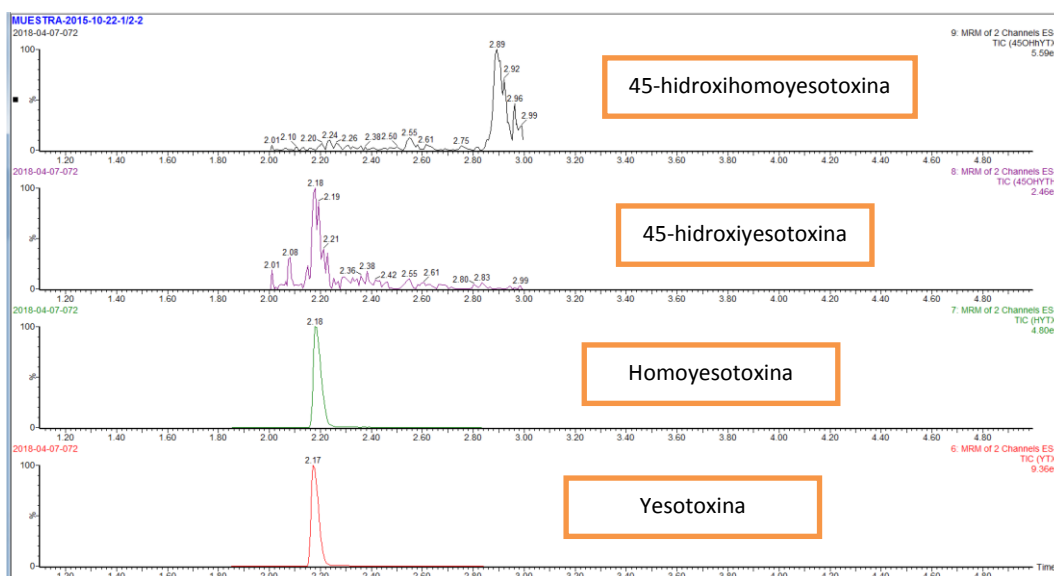


## Anexo 59. Cromatogramas muestra 2015-10-24

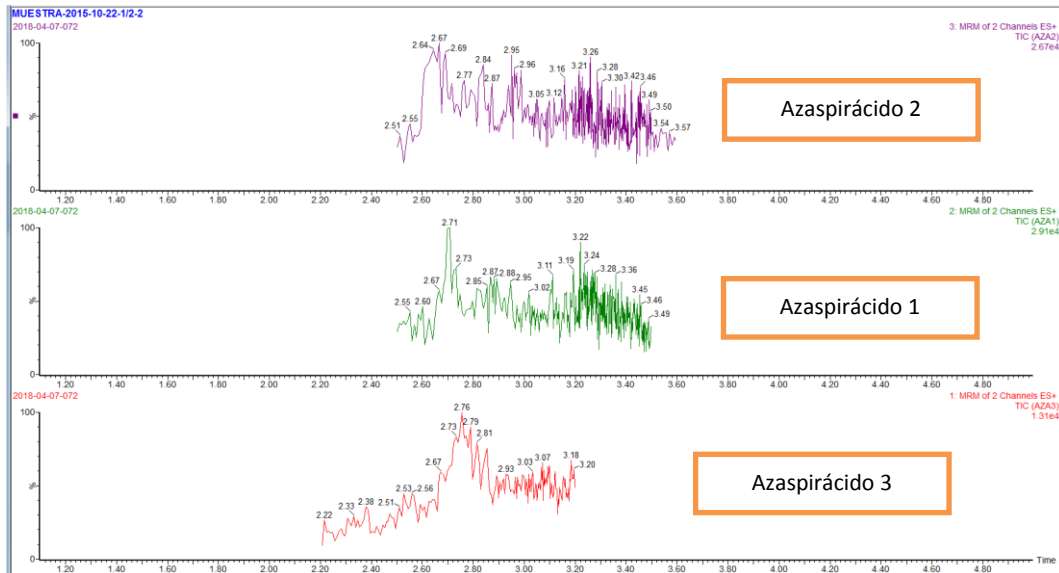
### A: Grupo del Ácido Okadaico



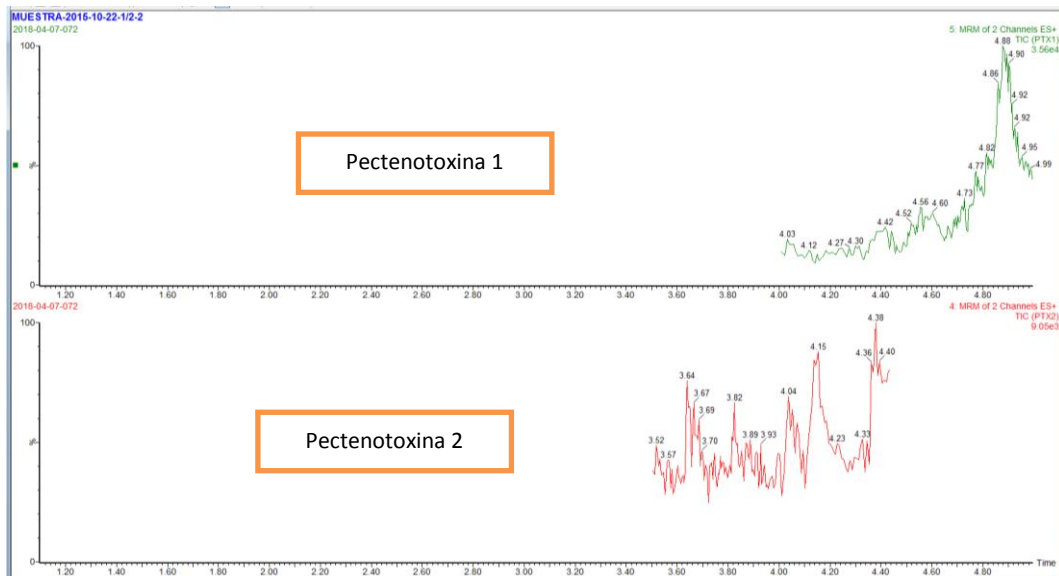
### B: Grupo de las Yesotoxinas



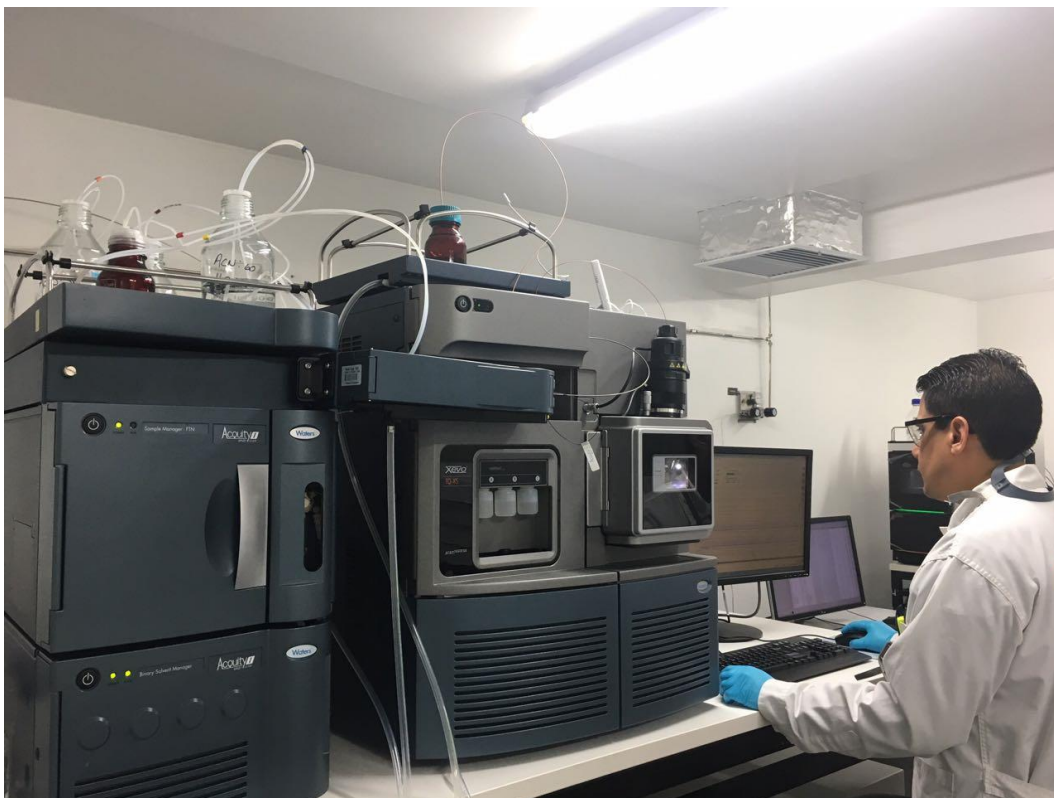
### C: Grupo de los Azaspirácidos



### D: Grupo de las Pectenotoxinas



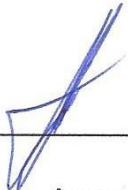
**Anexo 60. Equipo LC-MS/MS XEVO-TQXS marca WATERS**





---

Bach. Martín Diego Gálvez Pilco



---

Asesor

Dr. César Julio Cáceda Quiroz.