



TESIS DE DOCTORADO
MODALIDAD DE COMPENDIO
DE ARTÍCULOS

**MEJORA E INNOVACIÓN
EN LOS PROCEDIMIENTOS
DE DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE LOS
MÉTODOS DE ANÁLISIS DE
TOXINAS PSP**

Fdo.

Verónica Rey López

PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN BÁSICA Y
APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS

LUGO

2017

Prof. Dra. Dña. **Ana M. Botana López**, como Directora de la Tesis titulada: "Mejora e innovación en los procedimientos de detección y cuantificación de los métodos de análisis de toxinas PSP".

Por la presente **DECLARO**:


Que la Tesis presentada por Doña **Verónica Rey López** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta Tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra Tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Lugo, a 1 de Septiembre de 2017.



Ana M. Botana López
Doctora en Química
Codirectora de Tesis



Verónica Rey López



Plaza de Santo Domingo 20
5ª planta, 27001 Lugo
Tfn +34 608 073 245

Dr. D. **Álvaro Antelo Queijo**, como Director de la Tesis titulada: " Mejora e innovación en los procedimientos de detección y cuantificación de los métodos de análisis de toxinas PSP ".

Por la presente **DECLARO**:

Que la Tesis presentada por Doña **Verónica Rey López** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta Tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra Tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Lugo, a 1 de Septiembre de 2017.

Álvaro Antelo Queijo
Doctor en Química
Codirector de Tesis

Verónica Rey López

*A mis abuelos
porque nada me gustaría más en el mundo
que pudierais estar aquí para verlo.*

Quisiera agradecer...

Al Dr. Luis M. Botana por haberme brindado la OPORTUNIDAD de formar parte de su grupo de investigación. Señalo, OPORTUNIDAD, porque es lo que los jóvenes de hoy en día necesitamos para poder demostrar lo que valemos y sin duda es lo más difícil de lograr.

A la Dra. Ana M. Botana por confiar en mí y en mi trabajo, muchas veces incluso más que yo misma. Gracias por tu tiempo y dedicación, que no ha sido poco desde que en el año 2009 me embarcara en este mundo de las toxinas marinas. Gracias por tu ayuda, apoyo y sobre todo por tu perseverancia para enseñarme y ayudarme a mejorar. Gracias por TODO.

Al Dr. Álvaro Antelo Queijo por depositar su confianza en mí, por su ayuda en todo momento y sus sabios consejos. Para mí más que un director ha sido un compañero, gracias por tu cercanía. Echaré inmensamente de menos nuestras largas conversaciones.

A todos los que forman parte del departamento de Farmacología, que a pesar de la distancia, siempre que he necesitado ayuda la he tenido.

A los trabajadores de Cifga, en especial a Mercedes, por compartir conmigo sus conocimientos, por su colaboración y sus buenos consejos. Ha sido un placer poder compartir parte de esta etapa contigo.

A Marisa, mi compañera de trabajo durante una breve pero intensa etapa, sin duda la mejor de esta tesis. Obrigada amiga.

A mis amigas Sonia, Vicky, Bea, Patri y Marta por estar ahí siempre, por sus palabras de ánimo en los momentos más difíciles y por su inmenso apoyo. Gracias chicas.

A Miguel por su gran ayuda, esfuerzo y su valiosa tranquilidad.

A mi compañero de viaje porque ha sido la persona en la que más me he apoyado y la que ha vivido conmigo toda una montaña rusa de emociones a lo largo de estos años. Gracias por todo Javi.

A mi familia. A mi hermana pequeña que muchas veces ha tenido que hacer el papel de hermana mayor, gracias enana. A mi madre, porque todo lo que soy se lo debo a ella y sé que esto te hace inmensamente feliz.

A todos aquellos que a lo largo de estos años de una u otra manera habéis formado parte de mí día a día.

RESUMEN

En los últimos años, las floraciones de algas nocivas (FAN) han atraído cada vez más la atención tanto de la comunidad científica como de la sociedad. A pesar de que estos fenómenos naturales han tenido lugar a lo largo de toda la historia, se está observado en la actualidad un claro incremento en regiones costeras de todo el mundo. Por ello se han implementado medidas más eficaces y complejas para prevenir la intoxicaciones humanas por consumo de moluscos. El número de toxinas a ensayar ha sido actualizado a lo largo de los años al igual que los métodos a usar. Pero esto no es así con los animales que actúan como vectores de estas toxinas. La presente Tesis se centra en el grupo de toxinas paralizantes (PSP), para el cual existe un claro incremento de nuevos vectores. Por esta razón, uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la eficacia del método de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) y oxidación post-columna (PCOX) cuando se aplica a diferentes especies de moluscos, gasterópodos y crustáceos. Los resultados mostraron la necesidad de ajustar el método para las matrices estudiadas.

Además se realizó una comparación entre los dos métodos HPLC-FLD validados por la AOAC (pre-columna y post-columna) en muestras reales. Se concluyó que el método PCOX es una herramienta fiable para la identificación y cuantificación de las PSP. Las carencias de estos métodos junto con la reciente aparición de la tetrodotoxina (TTX) y sus análogos en las costas europeas ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos métodos químicos capaces de diferenciar entre ambos grupos de toxinas. Por esta razón, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue proponer nuevos métodos de análisis.

Se presenta un nuevo método HPLC-FLD con oxidación post-columna basado en el uso de una columna de carbono grafitizado poroso que demostró ser rápido, sensible y que posee la capacidad de distinguir las PSP de la TTX en un sólo análisis. Además se propone un nuevo proceso de limpieza de muestras que dio muy buenos resultados. Se aprovecharon las excelentes características que muestra la columna de carbono grafitizado poroso para la separación de las PSP y la limpieza obtenida en el método previo, para el desarrollo de un nuevo método de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Este método demostró ser capaz de separar un amplio número de toxinas PSP (hidrófilas e hidrófobas) junto con la TTX y su análogo 4,9-anhTTX, siendo el primer método químico capaz de realizar este análisis simultáneo.

Palabras clave: toxinas PSP, tetrodotoxina, interferencias de matriz, cromatografía líquida, carbono grafitizado poroso.

RESUMO

Nos últimos anos, as floracións de algas nocivas (FAN) atraeron cada vez máis a atención tanto da comunidade científica como da sociedade. A pesar de que estes fenómenos naturais tiveron lugar ao longo de toda a historia, estase observando na actualidade un claro incremento en rexións costeiras de todo o mundo. Por iso implementáronse medidas máis eficaces e complexas para previr as intoxicacións humanas por consumo de moluscos. O número de toxinas a ensaiar foi actualizado ao longo dos anos do mesmo xeito que os métodos a usar. Pero isto non é así cos animais que actúan como vectores destas toxinas. A presente Tese céntrase no grupo de toxinas paralizantes (PSP), para o cal existe un claro incremento de novos vectores. Por esta razón, un dos obxectivos deste traballo foi avaliar a eficacia do método de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) e oxidación post-columna (PCOX) cando se aplica a diferentes especies de moluscos, gasterópodos e crustáceos. Os resultados mostraron a necesidade de axustar o método para as matrices estudadas.

Ademais realizouse unha comparación entre os dous métodos HPLC-FLD validados pola AOAC (pre-columna e post-columna) en mostras reais. Concluíuse que o método PCOX é unha ferramenta fiable para a identificación e cuantificación das PSP. As carencias destes métodos xunto coa recente aparición da tetrodotoxina (TTX) e os seus análogos nas costas europeas poñen de manifesto a necesidade de desenvolver novos métodos químicos capaces de diferenciar entre ambos grupos de toxinas. Por esta razón, outro dos obxectivos desta Tese Doutoral foi propoñer novos métodos de análise. Preséntase un novo método HPLC-FLD con oxidación post-columna baseado no uso dunha columna de carbono grafitizado poroso que demostrou ser rápido, sensible e que posúe a capacidade de distinguir as PSP da TTX nunha soa análise. Ademais propónse un novo proceso de limpeza de mostras que deu moi bos resultados. Aproveitáronse as excelentes características que mostra a columna de carbono grafitizado poroso para a separación das PSP e a limpeza obtida no método previo, para o desenvolvemento dun novo método de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Este método demostrou ser capaz de separar un amplo número de toxinas PSP (hidrófilas e hidrófobas) xunto coa TTX e o seu análogo 4,9-anhTTX, sendo o primeiro método químico capaz de realizar esta análise simultánea.

Palabras chave: toxinas PSP, tetrodotoxina, interferencias de matriz, cromatografía líquida, carbono grafitizado poroso.

ABSTRACT

In recent years, harmful algal blooms (HABs) have attracted increasing attention from both the scientific community and society. Although these natural phenomena have occurred throughout time, a clear increase has been observed nowadays in coastal regions around the world. Therefore, more effective and complex measures have been implemented in order to prevent human intoxication from shellfish consumption. The number of toxins to be tested, as well as the method used, have been updated over the years; however this is not the case with animals that act as vectors for these toxins. This Doctoral Thesis focuses on paralytic shellfish toxins (PSP), for which there is a clear increase of new vectors. For this reason, one of the objectives of this study was to evaluate the efficacy of the high performance liquid chromatography method with fluorescence detection (HPLC-FLD) and post-column oxidation (PCOX) when it is applied to different species of shellfish, gastropods and crustaceans. The results showed the need to adjust the method for the matrices studied.

In addition, a comparison was made between the two HPLC-FLD methods which were validated by AOAC (pre-column and post-column) in real samples. It was concluded that the PCOX method is a reliable tool to identify and quantify PSP. The shortcomings of these methods, together with the recent appearance of tetrodotoxin (TTX) and its analogues on European coasts, reveal the need to develop new chemical methods that are able to differentiate between both groups of toxins. For this reason, another objective of this Doctoral Thesis was to propose new methods of analysis.

A new HPLC-FLD method with post-column oxidation based on the use of a porous graphitic carbon column, that proved to be fast and sensitive with the ability to distinguish PSP from TTX in a single analysis was presented. Moreover, a new sample clean-up procedure which showed very good results was proposed. The excellent characteristics of the porous graphitic carbon column for the separation of the PSP toxins and the sample clean-up procedure obtained in the previous method were used for the development of a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS). It proved to be able to separate all of PSP toxins (hydrophilic and hydrophobic) from the TTX and its analogue 4,9-anhTTX, thus being the first chemical method able to make this simultaneous analysis.

Keywords: PSP toxins, tetrodotoxin, matrix interferences, liquid chromatography, porous graphitic carbon .

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

AMPc:	adenosín monofosfato cíclico.
AMPA:	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.
AOAC:	Asociación Oficial de Químicos Analíticos.
ASP:	intoxicación amnésica por consumo de molusco.
AZAs:	azaspirácidos.
BTXs:	brevetoxinas.
CTXs:	ciguatoxinas.
C-CTXs:	ciguatoxinas del Caribe.
CFP:	intoxicación ciguatérica por consumo de pescado
CIs:	iminas cíclicas.
CM:	carne de molusco.
CTXs:	ciguatoxinas.
DA:	ácido domoico.
dcGTXs:	decarbamoilgonyautoxinas.
dcneoSTX:	decarbamoilneosaxitoxina.
dcSTX:	decarbamoilsaxitoxina.
doGTX2:	13-deoxidecarbamoilgonyautoxina 2.
doGTX3:	13-deoxidecarbamoilgonyautoxina 3.
doSTX:	13-deoxidecarbamoilsaxitoxina.
DSP:	intoxicación diarreica por consumo de molusco.
DTXs:	dinofisistoxinas.
EFSA:	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
ELISA:	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
eq:	equivalentes.
FAN:	Floraciones de algas nocivas.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
GCs:	toxinas hidroxibenzoato.
GMPC:	guanosin monofosfato cíclico.
GTXs:	gonyautoxinas.
GYMs:	ginmodiminas.
HABs:	floraciones algales nocivas.

HAc:	ácido acético.
hGER:	canales de potasio cardíacos humanos.
HPLC:	cromatografía líquida de alta eficacia.
HPLC-FLD:	HPLC con detección fluorescente.
HPLC-UV:	HPLC con detección ultravioleta.
I-CTXs:	ciguatoxinas del Océano Índico.
iso-DAs:	ácidos isodomoicos.
KT-3:	Killary toxina.
LC-MS:	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
LC-MS/MS:	LC-MS en tandem.
LOD:	límite de detección.
LOQ:	límite de cuantificación.
MBA:	bioensayo en ratón.
MeCN:	acetonitrilo
MeOH:	metanol.
neoSTX:	neosaxitoxina.
NSP:	intoxicación neurotóxica por consumo de molusco.
OA:	ácido okadaico.
PCOX:	oxidación post-columna.
P-CTXs:	ciguatoxinas del Pacífico.
PDE:	fosfodiesterasas.
PGC:	carbón grafito poroso.
PKC:	proteína quinasa C.
PLTX:	palitoxina.
PnTXs:	pinnatoxinas.
PP1:	fosfatasa proteica 1.
PP2A:	fosfatasa proteica 2A.
PreCOX:	oxidación pre-columna.
PSP:	toxinas paralizantes.
PtTXs:	pteriatoxinas.
PTXs:	pectenotoxinas.
RBA:	ensayos de unión a receptores.
RMN:	resonancia magnética nuclear.
SCCs:	compuestos de carbono de cadena larga.

SNC:	sistema nervioso central.
SPE:	extracción en fase sólida.
SPR:	resonancia de plasmón superficial.
SPXs:	espirólidos.
STX:	saxitoxina.
TCA:	ácido tricloroacético.
TFA:	ácido trifluoroacético.
TTX:	tetrodotoxina.
UE:	Unión Europea.
VGSC:	canales de sodio dependientes del voltaje.
YTXs:	yesotoxinas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. TOXINAS MARINAS	4
1.1.1. Grupo del ácido domoico (DA).....	8
1.1.2. Grupo ácido okadaico (OA)	10
1.1.3. Grupo de las ciguatoxinas (CTXs).....	13
1.1.4. Grupo de las palitoxinas (PLTXs)	15
1.1.5. Grupo de las pectenotoxinas (PTXs).....	18
1.1.6. Grupo de las yesotoxinas (YTXs).....	20
1.1.7. Grupo de los azaspirácidos (AZAs).....	22
1.1.8. Grupo de las brevetoxinas (BTXs)	25
1.1.9. Grupo de las iminas cíclicas (CIs).....	27
1.2. GRUPO DE LA TETRODOTOXINA (TTX).....	30
1.3. GRUPO DE LA SAXITOXINA (PSP).....	35
1.3.1. Métodos de análisis	43
2. OBJETIVOS	56
3. PUBLICACIONES	58
3.1. BLOQUE I: MEJORA EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS PSP.	64
Artículo 1. Influence of different shellfish matrices on the separation of PSP toxins using a postcolumn oxidation liquid chromatography method.	65
Artículo 2. Determination of gonyautoxin-4 in echinoderms and gastropod matrices by conversion to neosaxitoxin using 2-mercaptoethanol and post-column oxidation liquid chromatography with fluorescence detection.	66
Artículo 3. Quantification of PSP toxins in toxic shellfish matrices using post-column oxidation liquid chromatography and pre-column oxidation liquid chromatography methods suggests post-column oxidation liquid chromatography as a good monitoring method of choice.	67
3.2. BLOQUE II: INNOVACIÓN EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS PSP.	68
Artículo 4. Liquid chromatography with a fluorimetric detection method for analysis of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin based on a porous graphitic carbon column.	69
Artículo 5. Rapid analysis of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxins by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using a porous graphitic carbon column	70
4. DISCUSIÓN	99
5. CONCLUSIONES	115
6. BIBLIOGRAFÍA	117

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Se usa el término "Marea Roja" para definir el fenómeno natural que es provocado por un incremento del número de alguna o algunas microalgas en el agua. Dicho fenómeno forma parte de la sucesión planctónica anual. Sin embargo, en un año concreto puede variar con respecto a una serie de factores: lluvias excepcionales, aportes terrestres muy superiores a la media, vientos persistentes o incluso pueden haberse creado desequilibrios de origen antropogénico en las proporciones de nutrientes a través del transporte de aguas de lastre. Todas estas desviaciones de la media podrán inducir al comportamiento oportunista de una especie que, constituyendo parte de la flora local, aparezca ese año en concentraciones nunca vistas.

La proliferación masiva cada vez más frecuente de organismos fitoplanctónicos (dinoflagelados y diatomeas principalmente, pero también cianobacterias) que dan origen a episodios tóxicos, está determinada por las condiciones ambientales del medio en el que viven y la influencia de un gran número de factores físicos (salinidad, temperatura, luz del medio...) y químicos, como es la presencia de la contaminación en aguas costeras y el uso de fertilizantes en agricultura. No obstante, se desconoce la naturaleza precisa de los factores que ponen en marcha un clon tóxico [1].

Los moluscos bivalvos filtradores, tanto cultivados (principalmente mejillón y ostra) como los que viven parcial o totalmente enterrados (vieira, berberecho, almeja, navaja, etc.) se alimentan tomando del agua por filtración esas algas que forman, cuando su crecimiento es excesivo, las mareas rojas. El problema surge cuando esa marea roja produce toxinas, el molusco filtra las toxinas y las almacena en su cuerpo principalmente en su glándula digestiva o hepatopáncreas durante largos períodos de tiempo. Esas toxinas acumuladas no suponen un problema importante para el molusco, pero sí pueden ser un riesgo importante para el consumidor, que dependiendo del tipo de toxina puede sufrir diferentes cuadros clínicos de diversa consideración. No sólo los moluscos bivalvos se pueden ver afectados, ya que éstos actúan como vectores para transferir estos compuestos a peces, pájaros y como ya se ha mencionado, humanos.

Las floraciones de algas nocivas (FAN) o *Harmful Algal Blooms* (HAB) tienen un fuerte impacto en el sector pesquero de todo el mundo, causando mortalidades directas de peces (tanto de poblaciones silvestres como cultivadas) y la pérdida de hábitat, que conduce a una menor capacidad de carga de los ecosistemas.

Para garantizar la seguridad del consumo de bivalvos, se han implementado programas de vigilancia de floraciones de algas nocivas en Europa. Así se determina si las toxinas en los bivalvos exceden niveles que pueden provocar problemas sobre la salud humana. Cada vez que se alcanza un nivel crítico se prohíbe el consumo y se lleva a cabo el cierre de los polígonos situados en las zonas afectadas, lo que conlleva a grandes pérdidas en el sector de la acuicultura [2].

Por lo tanto, debido al creciente impacto de estos fenómenos y a su naturaleza impredecible, es un objetivo de gran importancia para la comunidad científica internacional el desarrollo de métodos de identificación y detección de estos productos tóxicos.

1.1. TOXINAS MARINAS

Las toxinas marinas son producidas principalmente por dinoflagelados, algas unicelulares microscópicas que forman parte del fitoplancton marino y que son el primer eslabón de la cadena alimentaria. Los dinoflagelados junto con las diatomeas son los responsables del fenómeno "Marea Roja", puesto que producen diferentes tipos de toxinas capaces de llegar al hombre a través de la cadena alimentaria. De las 5.000 especies de fitoplancton conocidas [3], sobre 300 especies (6%) son responsables de las mareas rojas, es decir, son capaces de provocar cambios en la coloración del agua, pero sólo unas 80 especies (1.6%) producen toxinas que pueden causar intoxicación por consumo de molusco en humanos (Figura 1) [4].

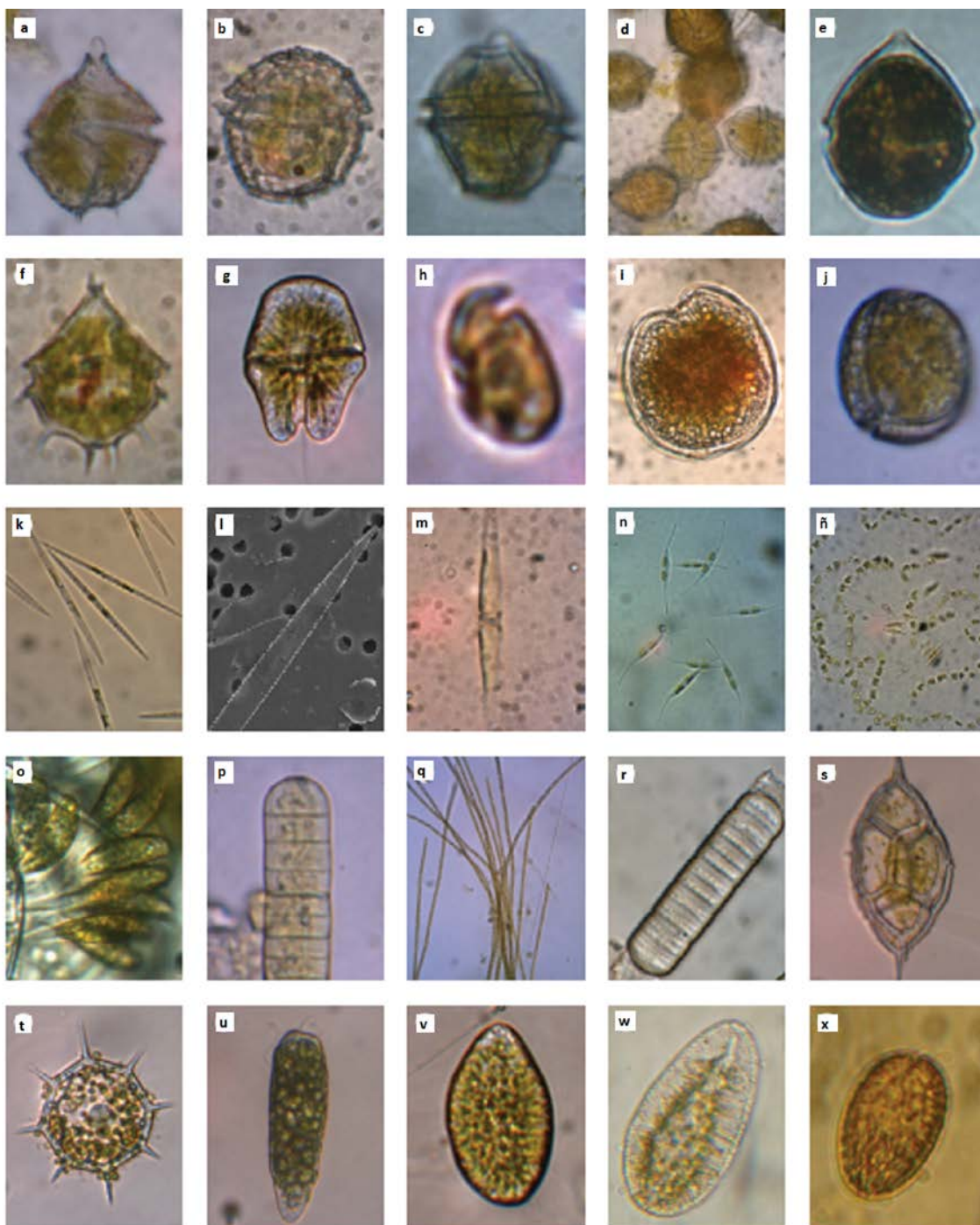


Figura 1. Imágenes de las principales microalgas nocivas. a) *Notiluca scintillans*, b) *Gymnodinium catenatum*, c) *Pyrodinium*(*P.*) *bahamense* var. *compressum*, d) *P. bahamense* var. *bahamense*, e) *Alexandrium*(*A.*) *tamiyavanichii*, f) *A. affine*, g) *Cochlodinium* (*C.*) *fulvescens*, h) *C. polykrikoides*, i) *Levanderina fissa*, j) *Polykrikos hartmannii*, k) *Dinophysis* (*D.*) *acuminata*, l) *D. caudata*, m) *D. fortii*, n) *D. tripos*, ñ) *D. ovum*, o) *Phalacroma* (*P.*) *mitra*, p) *P. rotundatum*, q) *Prorocentrum* (*Pr.*) *balticum*, r) *Pr. gracile*, s) *Pr. koreanum*, t) *Pr. mexicanum*, u) *Pr. triestinum*, v) *Pr. lima*, w) *Pr. minimum*, x) *Pr. rhathymum*

Las toxinas marinas se definen como metabolitos secundarios con actividad tóxica, originados por el metabolismo de estas especies de microalgas fitoplanctónicas [5]. Gran parte de la disparidad de los efectos provocados por las toxinas marinas es debido a la variedad de toxinas y análogos producidos por las microalgas, aunque la mayoría tienen influencia en la neurotransmisión o en la inhibición enzimática [6].

Las primeras clasificaciones de toxinas se basaron en los síntomas experimentados por los seres humanos después del consumo de moluscos [7, 8]. En base a esto, se distinguieron varios tipos de intoxicación por toxinas marinas: intoxicación paralizante por consumo de moluscos (causada por saxitoxina y tetrodotoxina), intoxicación neurotóxica por consumo de moluscos (causada por brevetoxinas), intoxicación diarreica por consumo de moluscos (causada por ácido okadaico), intoxicación amnésica por consumo de moluscos (causada por ácido domoico). Debido al descubrimiento continuo de nuevas toxinas, como los azaspirácidos que fueron descubiertos como una nueva categoría de intoxicación por consumo de moluscos, y la intoxicación por ciguatera asociada con el consumo de pescado, se ha visto que un mejor enfoque para la clasificación de las toxinas marinas sería en función de su estructura química [9]: esta es la clasificación recomendada por los expertos científicos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la que se empleará en la presente Tesis.

➤ **Clasificación de la toxinas marinas**

En base a la estructura química de las toxinas marinas se pueden distinguir diferentes grupos como se refleja en la tabla 1, donde además se muestran los tipos de intoxicaciones que provocan y los compuestos más representativos de cada grupo. En la misma también se indican los límites máximos permitidos de las toxinas que actualmente se encuentran reguladas en la Unión Europea (UE).

Tabla 1. Clasificación de las toxinas marinas

Grupo	Síndrome	Toxina/s representativa/s	Análogos más relevantes	Límite máximo establecido en la UE
Toxinas amnésicas	Intoxicación amnésica por consumo de molusco (ASP)	Ácido domoico (AD)	AD A-H y 5'-epi-AD	20 mg DA/ kg CM*
Toxinas diarreicas	Intoxicación diarreica por consumo de molusco (DSP)	Ácido okadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTXs)	DTX1, DTX2 y ésteres (DTX3, DTX4 y DTX5)	0.16 mg OA, DTX, PTX /kg CM*
Ciguatoxinas	Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (CFP)	Ciguatoxina del Pacífico-1 (P-CTX-1)	CTXs del Caribe (C-CTX), CTXs del Índico (I-CTX) y CTXs del Pacífico (P-CTX)	Ausencia**
Palitoxinas		Palitoxina (PLTX)	isoPLTX, ostreocinas y ovatoxinas	
Pectenotoxinas		Pectenotoxina-2 (PTX-2)	PTX-1 y PTXs-seco ácidas	0.16 mg OA, DTX, PTX/kg CM*
Yesotoxinas		Yesotoxina (YTX)	45 OH-YTX, homo-YTX y 45-OH-homo-YTX	3.75 mg YTX/kg CM*
Azaspirácidos	Intoxicación por azaspirácido	Azaspirácido-1 (AZA1)	AZA2, AZA3, AZA4, AZA5 y 37-epi-AZAs	0.16 mg AZA1/kg CM*
Brevetoxinas	Intoxicación neurotóxica por consumo de molusco (NSP)	Brevetoxina (BTX)	BTX-1	
Iminas cíclicas (CIs)		Espirólido-1 (SPX-1) y gymnodimina-A (GYM-A)	13,19-disdemetil SPX-C, 20-metil SPX-G, GYM-B y GYM-C	
Tetrodotoxinas		Tetrodotoxina (TTX)	4,9-anhTTX, 4, 4-epiTTX, ácido tetrodónico (TDA), 11-oxo-TTX y 11-deoxiTTX	
Toxinas paralizantes (PSP)	Intoxicación paralizante por consumo de molusco	Saxitoxina (STX)	Neosaxitoxina (neoSTX), gonyautoxinas (GTX) 1-6, decarbamoil gonyautoxinas (dcGTX) 1-4, decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), y C 1-4	0.8 mg STX eq/kg CM*

* CM: carne de molusco

** No existe límite legal en la EU pero sí es obligatorio que los productos pesqueros no contengan esta toxina

1.1.1. Grupo del ácido domoico (DA)

El ácido domoico se clasifica como una potente neurotoxina producida de forma natural por varias diatomeas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia*.

Desde que en 1987 se descubriera que el ácido domoico era un problema para la salud humana causando la intoxicación amnésica por consumo de moluscos [10], muchos han sido los casos de intoxicación descritos hasta el momento. Un ejemplo reciente es el mayor episodio tóxico ocurrido a lo largo de la costa este de Norte América desde mayo a agosto de 2015 [11]. La exposición al DA se ha vuelto más generalizada, además las floraciones tóxicas de *Pseudo-nitzschia* han aumentado tanto su frecuencia como su intensidad. Ésto sumado al significativo incremento global en el consumo de moluscos implica la necesidad de frecuentes revisiones, en particular las relativas a fuentes y riesgos para la salud humana que provoca el ácido domoico [12].

➤ Estructura química y análogos

El ácido domoico es un ácido amino tricarbóxico neuroexcitador de naturaleza polar y soluble en agua pero insoluble en disolventes orgánicos (Figura 2). Los tres grupos carboxilo son los responsables del carácter altamente hidrofílico y de la polaridad de la molécula [13]. Su estructura es similar a la de otras neurotoxinas: ácido glutámico y ácido kaínico [14]. Este compuesto tiene varios análogos: los ácidos isodomoicos designados desde A hasta H y el 5'-epi-ácido domoico [15]. Los isómeros están presentes en el medioambiente en menor concentración que el DA [12].

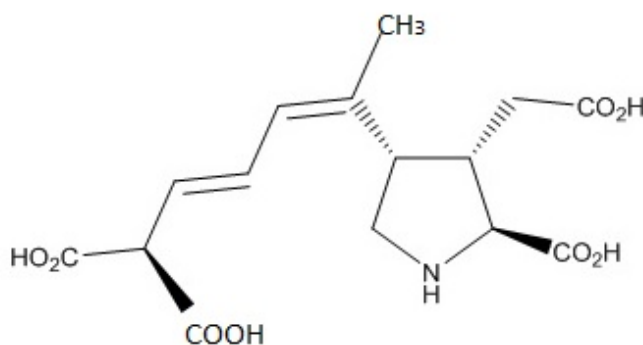


Figura 2. Estructura química del DA

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

El DA es una neurotoxina con una alta afinidad por el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA) y las subunidades kainato (receptores kainato), que son ambos receptores del glutamato y se encuentran presentes en el sistema nervioso central (SNC) y en el miocardio [16-18]. El DA forma enlaces muy fuertes con estos receptores de glutamato debido a la geometría de la toxina [19]. Esta unión induce a una despolarización de la célula, y como consecuencia a la disfunción y muerte celular [20, 21].

Los síntomas clínicos de la intoxicación ASP son muy variables y dependen tanto de la cantidad de toxina ingerida como del estado de salud de la persona intoxicada. Náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal son algunos de los síntomas gastrointestinales detectados en personas 24 horas después del consumo de molusco contaminado; a las 48 horas de la intoxicación aparecen los efectos neurológicos como confusión, pérdida de memoria, desorientación, convulsiones, coma y muerte [22].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Originalmente, el DA fue aislado de la microalga roja *Chondria armata*. Posteriormente se ha conocido la capacidad de producir dicha toxina de otras microalgas y diatomeas, principalmente del género *Pseudo-nitzschia* (*P.*). *P. australis*, *P. multiseriata* y *P. seriata* están reconocidas hasta el momento como las mayores productoras de ácido domoico [12].

Su presencia no sólo se limita al norte del continente americano, puesto que se han encontrado varias especies de moluscos que contienen DA en todo el mundo, incluyendo varios países europeos como Francia, Irlanda, Portugal y España [23, 24].

➤ Límite legal y métodos de análisis

Después del incidente de Canadá en 1987 [10] donde tras consumir mejillones que contenían DA al menos 4 personas murieron y 143 fueron hospitalizadas, se estableció como límite reglamentario 20 mg DA/kg en los tejidos comestibles; posteriormente este límite fue adoptado internacionalmente [25].

Inicialmente, el método del bioensayo en ratones (MBA) desarrollado por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), para la detección de toxinas paralizantes en moluscos [26], fue propuesto también para la detección del ácido domoico, pero este método no se puede usar con fines regulatorios debido a que los primeros síntomas en los ratones

empiezan con concentraciones de 40 mg DA/kg de molusco [27], superiores al límite reglamentario.

Los métodos analíticos son las técnicas más sensibles para la determinación de este grupo de toxinas y la cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta (HPLC-UV) es uno de los métodos sugeridos para su determinación en mejillón [28]. Actualmente es la técnica analítica preferida para su análisis en moluscos; además se dispone de un método validado oficialmente por la AOAC para determinación de DA en mejillones [29].

Por otra parte, la técnica de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS) ofrece excelente sensibilidad y también una gran selectividad en la determinación de DA en tejido de mejillón [27].

No obstante el reglamento (CE) N° 1244/2007 sugiere el uso del método oficial 2006.02 [30], como método de cribado, basado en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de toxinas del grupo DA. Este método muestra claras ventajas porque es sensible y rápido, puede ser automatizado, la formación para su uso es mínima y no requiere amplios equipos.

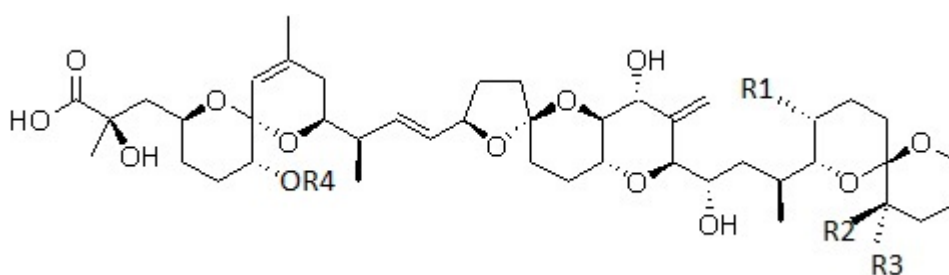
1.1.2. Grupo ácido okadaico (OA)

El primer caso de enfermedad gastrointestinal (vómitos y diarrea) asociada con el consumo de mejillones cocidos data del año 1961 en los Países Bajos, pero el agente causal no llegó a ser identificado [31]. No fue hasta 1970 cuando se asoció un brote de intoxicación diarreica con una densa floración de *Dinophysis* en la región de Chile, donde más de 100 personas sufrieron trastornos gastrointestinales severos después de comer mejillones, pero el caso apenas tuvo mención y no se informó de ello a la comunidad internacional hasta 1991 [32]. Desde entonces han sido muchos los casos de floraciones nocivas asociadas a toxinas diarreicas en regiones de todo el mundo, con Europa y Japón como principales áreas afectadas.

➤ Estructura química y análogos

La intoxicación diarreica es una intoxicación humana causada por el consumo de moluscos que contienen ácido okadaico y sus análogos, y las dinofisistoxinas (DTXs). Estas toxinas son conocidas como toxinas DSP. Todas ellas son poliéteres termoestables lipófilos.

El OA está formado por una cadena principal de 38 carbonos con un grupo carboxilo y cuatro grupos hidroxilos, y las DTXs son el resultado de la modificación química del OA (Figura 3), de manera que la DTX1 tiene un grupo metilo adicional en C35; la DTX2 sólo difiere del OA en la posición de un grupo metilo en la molécula mientras que la DTX3 se corresponde con una amplia gama de derivados esterificados del OA, la DTX1 y la DTX2 con ácidos grasos saturados e insaturados [33]. Tanto la DTX4 como la DTX5 son derivados sulfato del OA. Los compuestos relacionados con el OA descritos más recientemente son la norakadanona [34], el 19-epi-okadaico [35, 36] y el ácido beliceánico [37].



	R1	R2	R3	R4
OA	CH ₃	H	H	H
DTX1	CH ₃	CH ₃	H	H
DTX2	H	H	CH ₃	H
DTX3	CH ₃	CH ₃	H	acilo

Figura 3. Estructura química del AO y DTXs más comunes

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

En cuanto al mecanismo de acción se sabe que el efecto del OA y las DTXs se debe a la inhibición de la fosfatasa de serina/treonina, principalmente la 1 (PP1) y la 2A (PP2A) y que la inhibición de la PP2A es aproximadamente 200 veces superior a la de la PP1 [35]. Las fosfatasas de serina/treonina son un grupo de enzimas muy importantes que están estrechamente relacionadas con distintos procesos metabólicos esenciales en las células eucariotas [38, 39].

Se ha propuesto que el OA induce diarrea mediante la estimulación de la fosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio de las células intestinales, o mediante un

aumento de la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto o elementos de unión, responsables de la regulación de la permeabilidad de solutos, afectando al equilibrio del agua [40-43].

Los síntomas característicos de la intoxicación por DSP son diarrea, náuseas, vómitos y, en algunos casos, dolor abdominal, que comienza entre las 3 y las 12 horas después de la ingestión del molusco contaminado y se manifiestan durante un máximo de 3 días. No existen casos de muerte debido a la DSP hasta la fecha [44].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Mejillones, almejas, vieiras y ostras son los vectores más comunes de las toxinas DSP, pero no los únicos. Estas toxinas son producidas por un grupo de dinoflagelados, sobre todo del género *Dinophysis spp.* y *Prorocentrum spp.* [45-47], que al ser sustancias lipofílicas tienden a ser más abundantes en las partes grasas del animal. Los perfiles de toxinas producidas pueden variar dentro de la misma especie. En Europa el OA y su isómero DTX2 son las toxinas DSP predominantes y se encuentran en moluscos de Irlanda [48], Portugal y España [49]. La DTX1, que es el análogo metilo del OA, predomina en Japón [46, 50].

➤ Límite legal y métodos de análisis

El método MBA, se estableció inicialmente como método oficial para la detección de las DSP. Es un detector universal capaz de proteger la salud pública aunque tiene deficiencias y no se considera una herramienta apropiada para fines de control, debido a la alta variabilidad de los resultados, la insuficiente capacidad de detección y la limitada especificidad [51].

Aunque existen varios métodos como la cromatografía líquida de alta eficacia con detección fluorescente (HPLC-FLD), inmunoensayos y ensayos de inhibición de fosfatasas, que pueden emplearse como métodos alternativos para la detección de toxinas DSP, actualmente el método de referencia para la detección de toxinas lipofílicas es el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), validado por los laboratorios de referencia de toxinas de la UE en un estudio de validación interlaboratorio [52]. Esta técnica debe ser aplicada como método de referencia y se utiliza en análisis rutinarios.

El límite legal actualmente establecido en la Unión Europea (EU) es de 160 μg OA equivalentes (eq)/ kg de carne de molusco (CM) [53], para el OA y las DTXs (incluidas pectenotoxinas).

1.1.3. Grupo de las ciguatoxinas (CTXs)

La ciguatoxina (CTX) es una potente neurotoxina de carácter lipídico producida por peces y moluscos. Aunque inicialmente la intoxicación por ciguatera ha sido asociada a los dinoflagelados bentónicos del género *Gambierdiscus* (*G.*) *toxicus*, las ciguatoxinas no están producidas directamente por estas algas, sino que son productos resultantes de la bioconversión a lo largo de la transferencia trófica [54].

➤ Estructura química y análogos

Las CTXs son altamente estables, químicamente son compuestos poliéter cíclicos, solubles en lípidos y con fuertes esqueletos estructurales (Figura 4) [55, 56] que facilitan su retención durante el cocinado, congelado y la exposición tanto a medios básicos como ácidos. Ésto las hace propensas a bioacumularse a través de la cadena trófica [57, 58].

Hasta la fecha, más de 29 análogos de la CTX han sido identificados y agrupados de acuerdo a su distribución geográfica: CTXs del Océano Índico (I-CTXs), CTXs del Caribe (C-CTXs) y las más investigadas, CTXs del Pacífico (P-CTXs) [59], cuyo representante más conocido es la P-CTX-1.

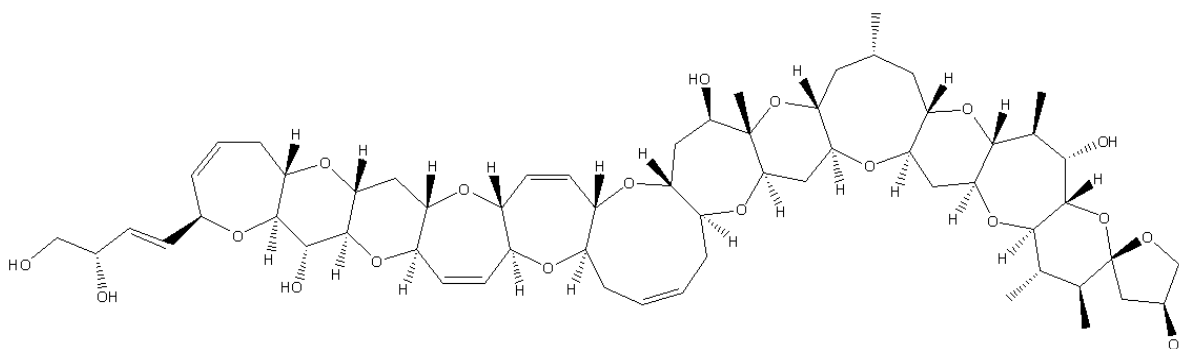


Figura 4. Estructura química de la P-CTX-1

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

La CTX actúa sobre los canales de sodio de los nervios, los músculos y las células cardíacas. Su acción primaria es incrementar la permeabilidad de las membranas excitables al ión Na^+ , causando como consecuencia la despolarización del tejido; los mecanismos celulares normales expulsan Na^+ y comienzan a tomar calcio. Ese aumento de Ca^{+2} intracelular interrumpe los sistemas de intercambio iónico, que resultan en la secreción de fluido presentándose la diarrea [60].

Se han reportado más de 175 síntomas de esta intoxicación que principalmente se caracteriza por presentar alteraciones gastrointestinales, neurológicas y cardiovasculares [60]. Los síntomas de la intoxicación por CTXs se manifiestan antes de transcurrir 12 horas desde la ingestión del pescado. Inicialmente aparecen algunos problemas gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal, que normalmente disminuyen antes de las 24 horas [61]. Los problemas cardiovasculares, generalmente una combinación de taquicardia con hipotensión, y los síntomas neurológicos también pueden aparecer aunque estas manifestaciones son menos frecuentes [62]. Las CTXs provocan el tipo de intoxicación alimentaria, debida a toxinas marinas, más común del mundo con 50.000 - 500.000 incidentes por año [63].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Aunque se sabe que el principal causante de la intoxicación por CTXs es el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*, otras especies de la familia *Gambierdiscus* (*G.*) son también productoras de estas toxinas como *G. pacificus* y *G. polynesiensis*. También pueden ser producidas por otros microorganismos como *Prorocentrum concavum*, *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum rhathytum*, *Gymnodinium sangienseum* y *Gonyaulax poliedra* [64]. Las toxinas producidas por las distintas especies se acumulan a lo largo de la cadena alimentaria: pasan de los peces herbívoros y especies que se alimentan de restos coralinos en los arrecifes a los órganos de los peces carnívoros que se alimentan de ellos [57].

Esta intoxicación es considerada endémica en áreas donde el consumo de pescado de arrecifes es común: estas áreas incluyen regiones del Caribe, el sur de Florida, Hawai, el Pacífico Sur y Australia [58, 65, 66]. Aunque la presencia de CTXs se restringía a estas zonas específicas, en los últimos años han sido detectadas en las costas europeas y en el Mar Mediterráneo [63], lo que sugiere una expansión de estas toxinas a nuevas áreas.

➤ Límite legal y métodos de análisis

En cuanto al control de las CTXs en la EU, el Reglamento CE N° 854/2004 [67] establece que se llevarán a cabo controles para que los productos de la pesca, puestos en el mercado, no contengan biotoxinas tales como CTX u otras toxinas peligrosas para la salud humana. Sin embargo, no se indican límites y no se presentan detalles específicos sobre la metodología analítica que ha de utilizarse para dichos controles.

Aunque no existe un método oficial para la detección de las CTXs, el MBA es el método más usado actualmente a pesar de que presenta una serie de desventajas como su falta de especificidad [68]. Existen tres tipos diferentes de métodos biomoleculares para las toxinas de este grupo: ensayos de citotoxicidad, ensayos celulares e inmunoensayos [68]. En cuanto a los métodos analíticos, la técnica HPLC-FLD se ha empleado para detectar CTXs en peces [69]. La principal desventaja que presenta este método es que no se obtienen límites de detección (LODs) suficientemente bajos. Los métodos LC-MS/MS podrían ser adecuados para su cuantificación puesto que permiten la detección de los análogos individuales de las toxinas de los grupos P-CTXs, C-CTXs e I-CTXs. Hasta ahora han sido aplicados únicamente en peces aunque deben ser desarrollados y validados, ya que ninguno de los métodos actuales de análisis ha sido formalmente validado, además de ser ampliados a otras matrices [68].

1.1.4. Grupo de las palitoxinas (PLTXs)

La palitoxina es una de las sustancias marinas no proteicas producidas por un dinoflagelado más venenosas conocidas hasta la fecha. Aunque las PLTXs fueron inicialmente asociadas con las CTXs hoy en día se han excluido de dicho grupo.

➤ Estructura química y análogos

Su caracterización química fue llevada a cabo en paralelo por dos grupos de investigación, y tardaron más de una década en lograrlo [70, 71]. La estructura química de la PLTX (Figura 5), presenta una larga cadena de alquilo que contiene 129 carbonos, parcialmente insaturada (con 8 dobles enlaces), 7 anillos éter, 64 centros quirales (lo que da lugar a un gran número de posibles estereoisómeros), 40-42 grupos hidroxilo y dos grupos amida [70].

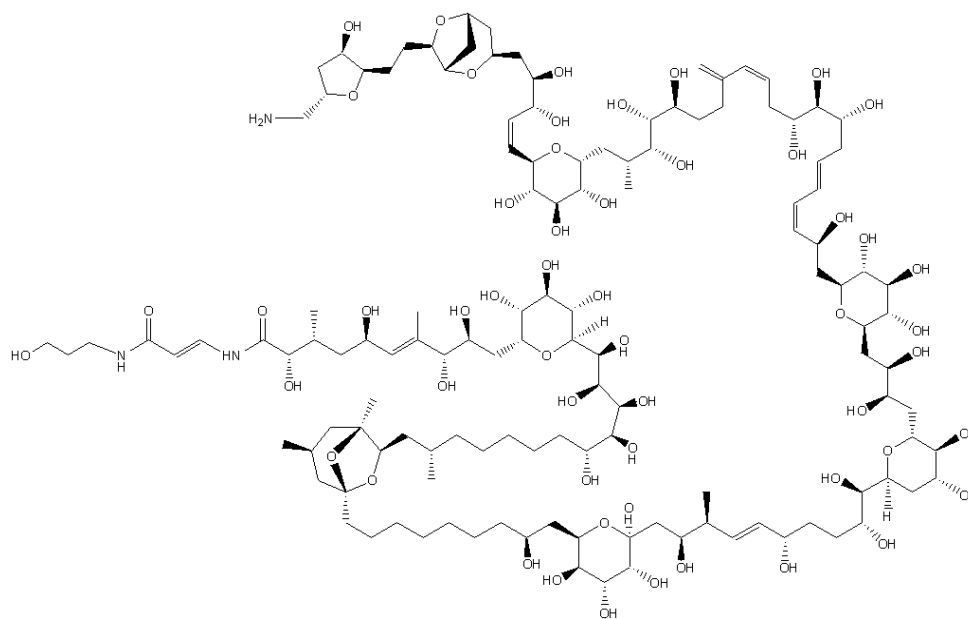


Figura 5. Estructura química de la PLTX

Durante la última década, el conocimiento de las moléculas tipo PLTX ha experimentado un gran avance, sus principales análogos son: homopalitoxina, bishomopalitoxina, neopalitoxina, deoxipalitoxina, y 42-hidroxi-palitoxina y además se incluyen en este grupo nuevos compuestos: como ostreocina-d, mascarenotoxina-a, -b y -c, y ovatoxina-a, -b, -c, -d y -e [72, 73].

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Los efectos de la PLTX sobre los equilibrios iónicos en los sistemas biológicos han sido descritos en numerosos trabajos. Las primeras investigaciones sobre las acciones de la PLTX datan de 1989 [74], esta investigación abrió el camino para el reconocimiento de que las moléculas de tipo PLTX actúan sobre la bomba Na^+/K^+ -ATPasa. El papel de esta bomba es la transferencia de tres iones Na^+ desde el interior de la célula al espacio extracelular, al mismo tiempo que importa dos iones K^+ en el citosol de la célula, a costa de la hidrólisis de una molécula de ATP. El funcionamiento correcto de la Na^+/K^+ -ATPasa es fundamental para la generación de gradientes de iones sodio e iones potasio a través de la membrana plasmática y para mantener el equilibrio osmótico en las células [75].

La mortalidad en seres humanos sólo ocurre en casos de ingestión, pero se han observado una gran variedad de síntomas no letales adicionales tras la exposición dérmica, ocular y la exposición por inhalación [76]. Los síntomas más comunes registrados durante la intoxicación por PLTX son: malestar general y debilidad, asociados con mialgia, efectos respiratorios (asma y dificultad para respirar), alteraciones del aparato neuromuscular y de la función cardíaca. Éstos varían mucho y dependen en gran medida de la ruta y la duración de la exposición: malestar gastrointestinal o dificultad respiratoria son comunes en caso de exposición oral e inhalación, respectivamente. Además, las propiedades irritantes de la PLTX provocan reacciones inflamatorias típicas del contacto cutáneo y la inhalación [77].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

La PLTX fue inicialmente aislada del coral *Palythoa toxica* de las Islas Hawai [78]; posteriormente esta toxina y una serie de sus análogos, fueron detectados en varias especies tropicales de *Palythoa* [71, 78-80]. Además, la PLTX y otros análogos, fueron identificados en varios dinoflagelados bentónicos de especies pertenecientes al género *Ostreopsis* [81-85].

Inicialmente estas toxinas eran producidas por especies localizadas en zonas tropicales y subtropicales, pero en la actualidad se han encontrado por todo el mundo, incluidos países europeos como Francia, Grecia, Italia y España [86-88].

➤ Límite legal y métodos de análisis

No existe una normativa que regule el grupo de PLTX en mariscos, ya sea en la UE, o en otras regiones del mundo. Sin embargo, su presencia en moluscos y en aerosoles marinos [86], indica que este grupo de toxinas son un riesgo sanitario para la población y genera por lo tanto la necesidad de establecer limitaciones en su cantidad en los productos marinos destinados al consumo humano y la vigilancia de su presencia en aguas de recreo y acuarios.

El MBA es una de las formas más sencillas para detectar la presencia de la PLTX y sus análogos en muestras biológicas y el más utilizado [76]: si bien los síntomas observados cuando se inyecta PLTX se diferencian de los causados por otras toxinas marinas comunes [89], este método presenta problemas éticos y desventajas técnicas.

La técnicas HPLC-UV, HPLC-FLD y LC-MS han sido ampliamente utilizadas para el estudio y la identificación de las PLTXs [81]. Son métodos que pueden ser herramientas valiosas para su determinación, pero es necesario tanto la optimización como la validación de

los mismos, así como el desarrollo de materiales de referencia certificados y normativa oficial en la UE para su control. El bombardeo por átomos rápidos y la resonancia magnética nuclear (RMN), además de otros, han sido cruciales para el reconocimiento de la estructura química de la PLTX y algunos de sus análogos, pero el elevado coste de estos métodos, la complejidad de los compuestos y la necesidad del alto nivel de entrenamiento del personal han imposibilitado su uso como herramientas de detección rutinaria [81]. Esto ha impulsado el desarrollo de métodos alternativos como ensayos de citotoxicidad, técnicas espectroscópicas e inmunoensayos [90].

1.1.5. Grupo de las pectenotoxinas (PTXs)

La PTX fue aislada por primera vez de las glándulas digestivas de vieiras *Patinopecten yessoensis* cultivadas en Japón [91]. Este grupo de toxinas ha sido incluido dentro del grupo de las DSP, debido a que se encuentran a menudo en combinación con el OA en moluscos. Sin embargo, existe un gran debate sobre si las PTXs deben ser clasificadas como toxinas del grupo DSP o no [44]. Algunos grupos de investigación han encontrado efectos diarreicos [92] mientras otros no han encontrado evidencias de esto [93, 94]; es por ello que existen autores que han propuesto eliminar las PTXs del grupo de las DSP [95].

➤ Estructura química y análogos

Estructuralmente estas toxinas son compuestos poliéteres macrocíclicos con un anillo lactona (Figura 6). Hasta la fecha un total de 15 análogos de la PTX han sido encontrados tanto en cultivos de algas como en moluscos. De todos los análogos conocidos sólo cuatro PTXs han sido identificados como productos biosintéticos reales de algas: PTX-2, PTX-12, PTX-11 y PTX-13; el resto parecen ser productos de la metabolización de los moluscos [96]. Dentro de las PTXs existe un subgrupo resultante de la metabolización por los moluscos que son las ácido pectenotoxinas-seco (PTXs-SA) y sus ésteres, que se caracterizan por tener el grupo lactona abierto lo que les da forma de ácido libre [44].

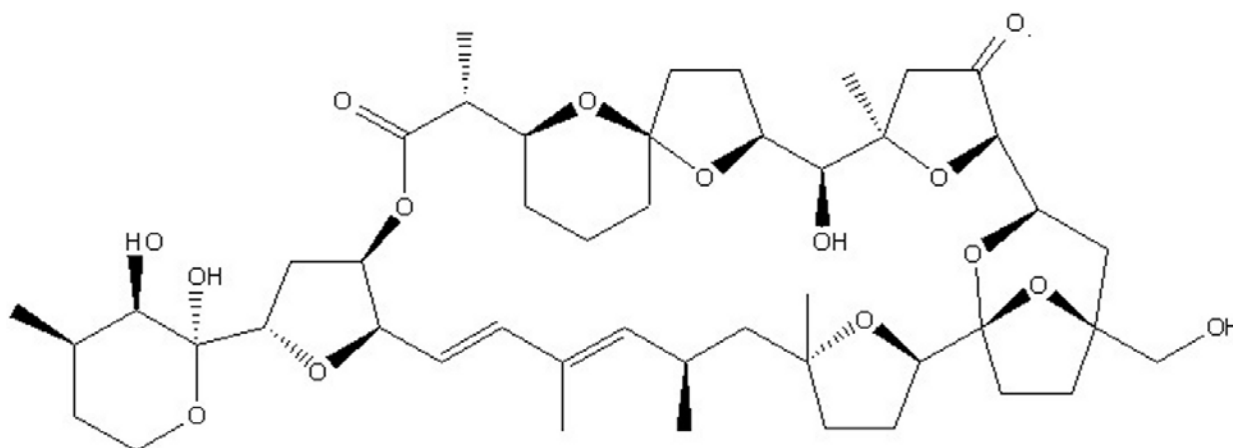


Figura 6. Estructura química de la PTX

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Las PTXs no inducen diarrea y tampoco inhiben a las fosfatasa de proteínas PP2A y PP1 [97], principales efectos que muestran las toxinas DSP. Exhiben una potente citotoxicidad y se ha podido demostrar también que inducen la despolarización del citoesqueleto de actina [44].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

El dinoflagelado *Dinophysis (D.) fortii* fue identificado inicialmente como el productor real de las PTXs [98], aunque también se han encontrado estas toxinas en *D. acuminata* [99], *D. acuta* [100], *D. caudata* [101], *D. rotundata* y *D. norvegica* [44]. Además, las PTXs fueron detectadas en muestras de dinoflagelados heterótrofos *Protoperdinium divergens*, *Protoperdinium depressum*, y *Protoperdinium crassipes* [102].

Las PTXs están presentes en microalgas y en moluscos bivalvos de varias partes del mundo, como Nueva Zelanda, Australia, Japón y en varios países europeos como Italia, Irlanda, Noruega, Portugal y España [103].

➤ Límite legal y métodos de análisis

Para la detección de las PTXs se emplean tanto el MBA como métodos químicos, pero no existe hasta el momento un método oficial validado. Se han publicado varios métodos de análisis químico para su determinación, entre ellos se encuentran los de HPLC tanto con detección UV como FLD, que son aplicables para cuantificar las toxinas en muestras de

plancton y métodos LC-MS/MS que tienen potencial para la cuantificación de PTXs en muestras de bivalvos, aunque se necesitan más estudios para llegar a establecerlos como métodos de referencia [104].

Actualmente en la UE el límite legal establecido es de 16 mg de OA, DTXs y PTXs por kg de carne de molusco [53]. Este límite incluye a las PTXs dentro del grupo de las toxinas DSP (OA y DTXs), sin embargo dado que son toxinas consideradas por diversos autores como un grupo independiente, sería necesaria una reevaluación de esta regulación para ajustar los límites reglamentarios actuales [104].

1.1.6. Grupo de las yesotoxinas (YTXs)

La yesotoxina fue inicialmente aislada en 1986 en la bahía de Mutsu, Japón, a partir de las glándulas digestivas de vieira *Patinopecten yessoensis* después de un episodio de intoxicación humana [105]. Su inclusión en la lista de toxinas marinas se debe al hecho de que coexiste con toxinas diarreicas (OA y DTXs) y causa la muerte en ratones tras la inyección intraperitoneal, pero se sabe que su toxicidad oral es baja y no existen registros de intoxicaciones en humanos hasta la fecha [106].

➤ Estructura química y análogos

La YTX es una sustancia poliéter disulfatada, que posee un esqueleto de 47 carbonos en forma de escalera (Figura 7). Su estructura consta de 11 anillos adyacentes de éter de diferentes tamaños y una cadena lateral insaturada de 9 átomos de carbono con distintos grupos funcionales, además de uno o más de sulfato que aumenta la polaridad de la molécula [105].

Más de 90 análogos han sido descubiertos hasta la fecha aunque no todos han sido identificados y aislados [107]. Actualmente se han identificado alrededor de 40 derivados naturales de la YTX y se han caracterizado por RMN o por LC-MS/MS [108]. Algunos análogos son producidos directamente por dinoflagelados como la YTX y homo-YTX, mientras otros fueron encontrados sólo en moluscos pues son producidos por el metabolismo del propio molusco, como 45-OH-YTX y carboxi-YTX [108].

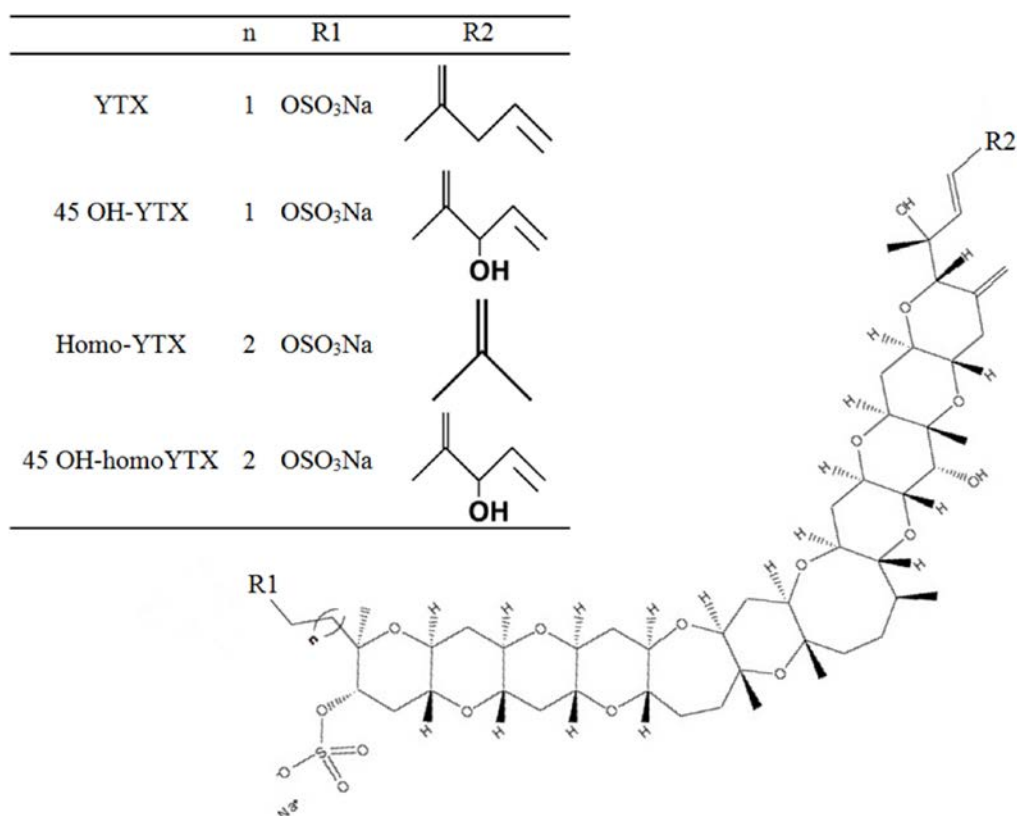


Figura 7. Estructura química general de la YTX y sus principales análogos

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Dado que las YTXs pueden coexistir con el OA, inicialmente fueron englobadas dentro del grupo de las DSP, por lo tanto para aclarar el mecanismo de acción de las YTXs se estudió el efecto de este grupo de toxinas sobre la fosfatasa de serina/treonina, y se concluyó que la acción de las YTXs no inhibía estas enzimas [109]. Las YTXs actúan directamente sobre los niveles de Ca en el citosol, adenosín monofosfato cíclico (AMPC), proteína quinasa C (PKC), las fosfodiesterasas (PDE) y la guanosín monofosfato cíclico (GMPC), además de influir en la actividad mitocondrial y producir la destrucción y apoptosis en células humanas [110].

Los síntomas de intoxicación producidos por las YTXs en humanos son relativamente desconocidos debido a que hasta la fecha no se han dado casos de este tipo de intoxicación. Sin embargo, se sabe con claridad que las YTXs no producen diarrea en humanos [111].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Protoceratium reticulatum, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera* fueron identificados como los dinoflagelados productores de este grupo de toxinas [105, 107, 112]. Además de en Japón, las YTXs han sido identificadas en moluscos de varios países de Europa, incluyendo España, Italia, Noruega, el Mar Adriático, Rusia, Chile y Nueva Zelanda [110].

➤ Límite legal y métodos de análisis

La determinación de las YTXs es compleja debido al gran número de análogos existentes y sus propiedades de solubilidad comunes con otras toxinas lipofílicas. Existen varios métodos para su detección, entre ellos se encuentra el MBA que también en este caso es el método oficial [52]. Este grupo de toxinas también puede ser detectado mediante HPLC-FLD, LC-MS, inmunoensayos y biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) [108], entre otros.

La Unión Europea ha elevado recientemente el límite legal para las YTXs de 1 a 3.75 mg YTX equivalente/ kg de carne de molusco [113], ya que como se ha mencionado, las intoxicaciones en humanos debidas a las YTXs no han sido nunca informadas.

1.1.7. Grupo de los azaspirácidos (AZAs)

Los azaspirácidos se identificaron por primera vez en la década de los 90 después de un brote de intoxicación en seres humanos sucedido en los Países Bajos. Fue debido al consumo de mejillones contaminados procedentes de Puerto Killary, Irlanda [114]. Los síntomas que mostraban las personas intoxicadas eran típicos de las toxinas DSP, pero los niveles detectados de DSP estaban muy por debajo del nivel reglamentario. Posteriormente, se estableció que estaban contaminados con una toxina marina única, originalmente llamada "toxina Killary" o KT-3, que más tarde fue renombrada como azaspirácido [115].

➤ Estructura química y análogos

El nombre de este grupo de toxinas se debe a que su estructura química está formada por anillos azaspiro de 5 y 6 miembros, uno de ellos unido a un anillo 2,9-dioxobicyclononano y en el otro extremo de la molécula un ácido carboxílico (Figura 8). Los AZAs difieren de

cualquier otra toxina nitrogenada previamente conocida, ya que poseen disposiciones únicas: una amina cíclica en lugar de un grupo imino cíclico, sin anillo carbocíclico o de lactona [115].

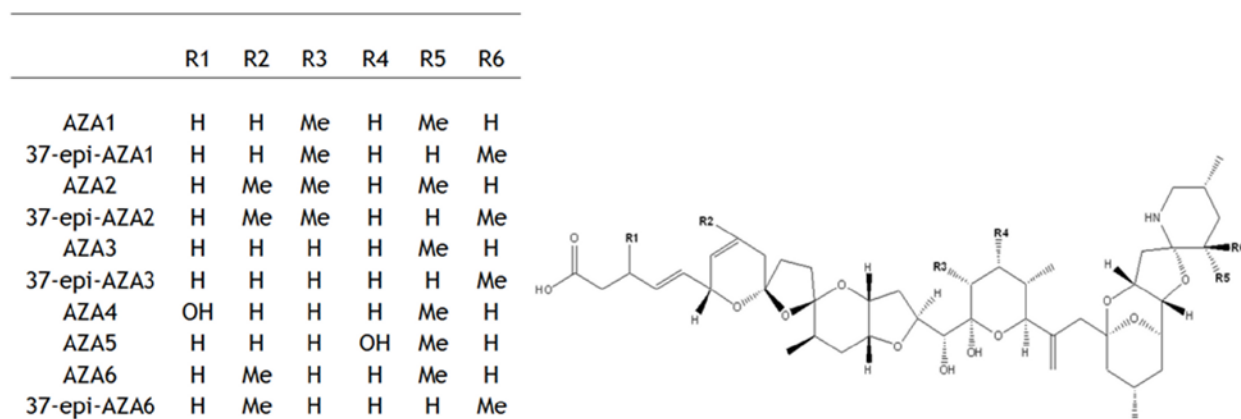


Figura 8. Estructura química de los AZAs y sus análogos más representativos

Hasta la fecha, se han identificado más de 30 análogos en fitoplancton y moluscos [116]. De la carne de los mejillones responsables de la intoxicación sucedida en los Países Bajos [114], se consiguió aislar azaspirácido-1 (AZA1). Dos nuevos análogos, azaspirácido-2 (AZA2) y azaspirácido-3 (AZA3), fueron aislados de mejillones recolectados en la Isla de Arranmore en Irlanda en 1997, que causaron un nuevo episodio de intoxicación humana. Estos dos análogos fueron definidos estructuralmente como 8-metilazaspirácido (AZA2) y 22-dimetilazaspirácido (AZA3) [117]. También se consiguió aislar azaspirácido-4 (AZA4) y azaspirácido-5 (AZA5), y se determinaron sus estructuras, 3-hidroxi-22-dimetilazaspirácido y 23-hidroxi-22-dimetilazaspirácido, respectivamente [118]. Estudios posteriores revelaron la existencia de más de 20 análogos pertenecientes a este grupo, incluyendo 37-epi-AZAs, dihidroxi-AZAs y carboxi-AZAs en mejillones recolectados durante un evento tóxico en la costa noroeste de Irlanda ocurrido en 2005 [119, 120].

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Dada la similitud de la sintomatología provocada por la ingesta de moluscos contaminados con AZAs y con DSPs, los AZAs se clasificaron originalmente junto con las toxinas DSP. Como se ha descrito anteriormente las DSPs son inhibidores de las fosfatasa

(PP1, PP2A), por ello se postuló también como mecanismo de acción más probable de los AZAs, pero varios trabajos han demostrado que no es así [121, 122]. Aunque hasta la fecha el mecanismo de acción de los AZAs permanece todavía desconocido, sí se han descrito algunos de sus efectos: son potentes agentes citotóxicos que causan cambios morfológicos y del citoesqueleto en la actina y proteínas de membrana [122, 123], provocan alteraciones en el flujo de iones en diversos tipos de células [124-126] y actúan como bloqueantes agudos de los canales de potasio cardíacos humanos (hGER) [127].

El consumo de alimentos marinos contaminados por AZAs induce una enfermedad aguda caracterizada por síntomas gastrointestinales, que se manifiestan horas después de la ingestión de las toxinas, además incluye náuseas, vómitos, diarrea severa y calambres en el estómago. Los síntomas pueden persistir durante 2-3 días [128, 129]. Hasta la fecha no se han reportado efectos a largo plazo.

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Los AZAs fueron detectados tanto en plancton como en agua de mar, pero no fue hasta el año 2007 cuando se descubrió el organismo productor de estas toxinas [130]. Se trata de un pequeño dinoflagelado, que más tarde fue llamado *Azadinium spinosum* [131], fácilmente destruido en los procedimientos estándar para el análisis de plancton. Se conocen un total de 4 especies capaces de producir AZAs (*Azadinium spinosum*, *Azadinium poporum*, *Azadinium dexteroporum*, *Amphidoma languida*) [116].

En los últimos años, los AZAs han sido encontrados en moluscos de muchas regiones costeras de Europa occidental, norte de África, y norte y sur de América [116]. Se han documentado un total de 6 casos de intoxicación por consumo de mejillones contaminados con AZAs [117, 132, 133], pero aunque el principal vector sea el mejillón, estas toxinas se han aislado también en otros moluscos bivalvos, además de en algunas especies de crustáceos o en esponjas [116].

➤ Límite legal y métodos de análisis

En el caso de los AZAs la UE determinó que el nivel máximo es de 160 µg de AZA1 eq/kg CM [53].

El método de referencia oficial para su detección durante muchos años fue exclusivamente el MBA, pero desde 2011 se reconoce LC-MS/MS como método de

referencia para la detección de AZAS (AZA1, AZA2 y AZA3) y desde 2014 es el único método oficial [52].

1.1.8. Grupo de las brevetoxinas (BTXs)

Las brevetoxinas son producidas por el dinoflagelado *Karenia (K.) brevis*, muy común en las aguas del Golfo de Méjico, y es el organismo responsable de las mareas rojas que afectan principalmente a Florida y a Texas. Son las responsables de la muerte masiva de peces, de la mortalidad de mamíferos y, en el ser humano, de la intoxicación neurotóxica por consumo de moluscos y de síntomas similares al asma a través de la ingestión o inhalación de aerosoles [134].

➤ Estructura química y análogos

Estructuralmente las BTXs son un grupo de compuestos poliéteres cíclicos liposolubles estables al calor cuyo esqueleto está formado por 10-11 anillos éter con una lactona en uno de sus extremos (Figura 9). Las BTXs se dividen en dos grupos dependiendo de su esqueleto: de tipo A y de tipo B. Las de tipo A poseen 10 éteres cíclicos mientras que las de tipo B tienen 11 éteres cíclicos [135].

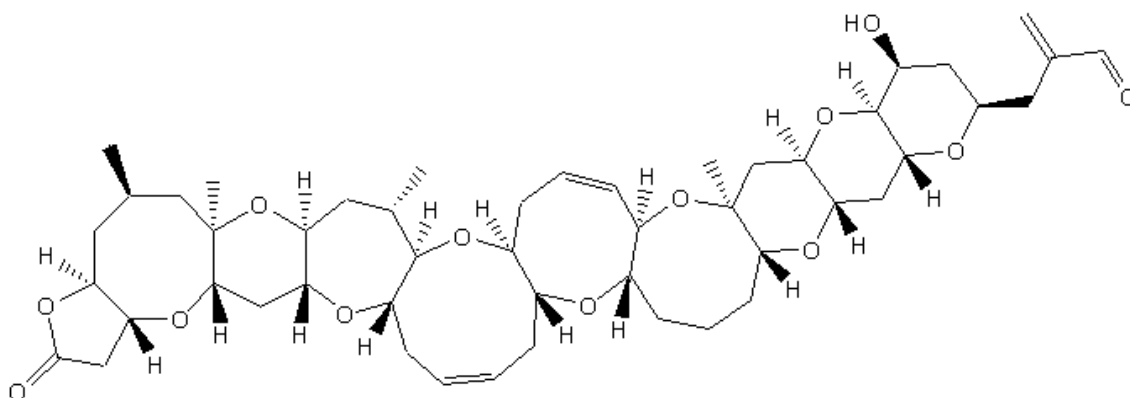


Figura 9. Estructura química de la BTX-1 (tipo A)

Se han identificado numerosos análogos y derivados en floraciones y cultivos de *K. brevis*. Estos compuestos se clasifican en función de las diferencias en su estructura química y se encuentran al menos 10 formas diferentes. Las tres BTXs más abundantes encontradas en las floraciones que tienen lugar en la costa de Florida son la BTX-1 y la BTX-2, y la BTX-3 como producto primario de la reducción de la BTX-2. Cabe destacar que la BTX-2 es la más abundante mientras que la BTX-1 es la más potente [135].

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Las BTXs muestran gran afinidad por el sitio 5 en la subunidad α de los canales de sodio dependientes del voltaje (VGSC), causando una cascada de eventos patológicos que eventualmente pueden conducir a la muerte celular [136]. Actúan abriendo los canales, alterando las propiedades de las células excitables y aumentando el flujo de iones Na^+ en la célula. Este flujo incontrolado de iones Na^+ en las células conduce a la despolarización de las membranas celulares de las células neuronales y musculares [135].

En humanos, la intoxicación por BTXs se produce tanto a través del consumo de moluscos que contienen estas toxinas, dando como resultado la intoxicación neurotóxica, como a través de la inhalación de aerosoles oceánicos, lo que provoca complicaciones respiratorias afectando particularmente a pacientes asmáticos.

Las toxinas NSP causan una serie de síntomas, tanto neurológicos como gastrointestinales. Los más comunes son: náuseas, vómitos, diarrea, entumecimiento y hormigueo tanto en labios, boca y cara como en las extremidades, pérdida de coordinación general, parálisis parcial de las extremidades, dolor de cabeza, dilatación de las pupilas y fatiga general. Los síntomas gastrointestinales se manifiestan al mismo tiempo que los síntomas neurológicos, siendo estos últimos los que persisten durante más tiempo [137]. Aunque en algunos casos de intoxicación ha sido necesaria la hospitalización, no se han reportado hasta la fecha casos de muerte como resultado de intoxicación NSP. La mayoría de los pacientes se recuperan en un plazo de dos o tres días, y no muestran efectos crónicos a largo plazo. En cuanto a la inhalación de aerosoles, estudios recientes sugieren que produce un síndrome caracterizado por problemas respiratorios que incluyen irritación e incomodidad en las vías respiratorias superiores y disminución de la función pulmonar, además de irritación ocular [62].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Karenia brevis es el principal dinoflagelado responsable de la producción de las BTXs que aparece de forma natural en el Golfo de México, Mar Caribe y a lo largo de las costas de Nueva Zelanda, Florida y Texas. Las floraciones de numerosas *Karenia sp.* se han reportado en lugares de todo el mundo, sin embargo hasta ahora no se han encontrado en peces o moluscos de Europa [103].

➤ Límite legal y métodos de análisis

Como en los casos anteriores, el MBA se ha empleado tradicionalmente para la detección de toxinas del grupo de las BTXs. Se han desarrollado ensayos in vitro e inmunoensayos como alternativas al MBA, aunque necesitan un mayor desarrollo. Los métodos LC-MS/MS ofrecen una opción muy valiosa para la cuantificación de las BTXs, aunque el principal inconveniente que se encuentra es la falta de materiales de referencia certificados que permitan validar y desarrollar este tipo de métodos [138].

Dado que estas toxinas no se han encontrado en Europa, todavía no se ha establecido ninguna legislación para ellas y tampoco programas de vigilancia.

1.1.9. Grupo de las iminas cíclicas (CIs)

Las iminas cíclicas son el grupo de biotoxinas marinas de descubrimiento más reciente. La clave que permitió su identificación fue su toxicidad de acción rápida, induciendo una muerte rápida en el bioensayo de ratones; además se observó un efecto "todo o nada", en donde una inyección intraperitoneal de concentraciones tóxicas que no llegan a ser letales en ratones, no produce secuelas en el animal y éste es capaz de recuperarse por completo [139].

➤ Estructura química y análogos

Estructuralmente son compuestos macrocíclicos que contienen grupos imina y grupos éter con uniones tipo espiro en su estructura [140]. Este grupo de toxinas incluye 8 tipos de compuestos producidos por dinoflagelados: espirólidos, gymnodiminas, pinnatoxinas (PnTXs), pteriatoxinas (PtTXs), procentrólidos, espiro-procentrimina [140, 141], simbioiminas [142] y portiminas [143]. Se consideran todas estas toxinas dentro del mismo grupo de las CIs por dos razones: primero, por su semejanza en la estructura química y

segundo, por su similitud en la toxicidad intraperitoneal en ratones [139]. En la Figura 10 se muestra la estructura química de los SPX-1 y GYM-A que son las toxinas más representativas de los dos subgrupos mayoritarios, SPXs y GYMs, y mejor caracterizados de este grupo de biotoxinas marinas.

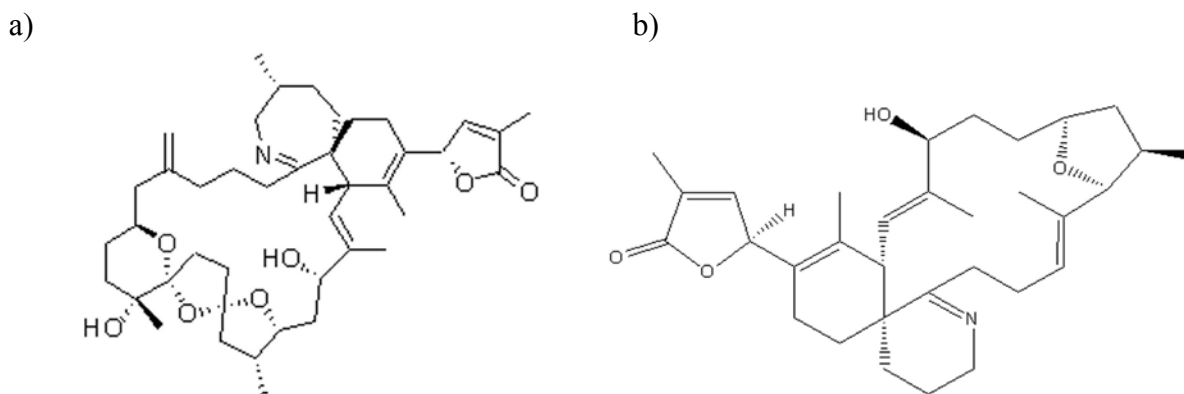


Figura 10. Estructura química: a) SPX-1 , b) GYM-A

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

La falta de materiales de referencia ha dificultado las investigaciones sobre el mecanismo de acción de este complejo grupo de toxinas. Son potentes neurotoxinas y hay evidencias de que su acción neurotóxica se basa en la inhibición de los receptores nicotínicos y muscarínicos de acetilcolina en el sistema nervioso central y periférico y en la unión neuromuscular [140].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Los SPXs fueron identificados por primera vez en Nueva Escocia (Canadá) en el año 1995 [144] y desde entonces se han detectado en Norte América y Europa. Además han sido encontrados en marisco, plancton y agua marina en diferentes partes del mundo [145]. Son metabolitos de los dinoflagelados *Alexandrium ostenfeldii* y *Alexandrium peruvianum* y se encuentran a menudo en presencia de otras toxinas marinas como las toxinas paralizantes (PSP). Se conocen 12 análogos de este grupo de toxinas siendo 13-desmetil SPX-C, también conocido como SPX-1, la toxina de referencia de este grupo. Son el grupo más grande dentro de las CIs [140].

Las GYMs son producidas por el dinoflagelado *Karenia selliformis*. La estructura inicial fue descubierta en 1995 en Nueva Zelanda [146]. A esta GYM descubierta inicialmente se le denomina GYM-A y se conocen dos análogos más GYM-B y GYM-C. También se han reportado brotes de intoxicación por la GYM-A en Túnez y Australia [140].

Las PnTXs fueron descubiertas por primera vez en extractos de glándulas digestivas de almeja *Pinna attenuata* después de un brote ocurrido en China y Japón [147]. Este bivalvo, en concreto su músculo aductor, es muy popular como ingrediente de sushi en China y Japón, por lo que las intoxicaciones alimentarias por ingesta de este grupo de toxinas ocurren con frecuencia [140]. Este subgrupo cuenta con 7 análogos (A, B, C, D, E, F y G) y en los últimos años se ha detectado su presencia en moluscos de Europa y Noruega [148].

Las PtTXs fueron aisladas en el año 2001 a partir de la ostra *Pteria penguin* [149]. Este subgrupo está formado por tres análogos (A, B y C). Aunque este tipo de ostra está ampliamente distribuido no han sido encontradas estas toxinas en Europa todavía, y su presencia se limita exclusivamente a moluscos japoneses [150].

Los proroentrólidos son el subgrupo de las CIs que presentan mayor tamaño con pesos moleculares alrededor de 1000 Da. Existen dos análogos: proroentrólido A, aislado en el año 1988 por primera vez a partir del dinoflagelado *Prorocentrum lima* [151] y proroentrólido B, aislado posteriormente del dinoflagelado *Prorocentrum maculosum* [152].

La espiro-prorocentrimina es la única toxina de este subgrupo, no existen análogos conocidos hasta la fecha. Es una toxina polar liposoluble que fue aislada de una cepa bentónica de *Prorocentrum spp.* en Taiwán [153].

Algunos autores [142, 143] incluyen dentro del grupo de las CIs las simbioiminas y las portiminas. Las simbioiminas son producidas por el dinoflagelado simbiótico *Symbiodinium spp.*, un tipo de zooxantela que se encuentra en una amplia gama de invertebrados marinos y que tienen la capacidad de producir compuestos conocidos como los compuestos de carbono de cadena larga (SCCs) [142]. Las portiminas son otro subgrupo aislado del dinoflagelado bentónico marino *Vulcanodinium rugosum* recolectado en Nueva Zelanda [143].

➤ Límite legal y métodos de análisis

Las CIs no han estado directamente ligadas a intoxicaciones humanas en Europa, pero la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) solicitó más datos de exposición para evaluar adecuadamente el riesgo que las CIs plantean a los consumidores de moluscos [154].

La falta de datos toxicológicos impide que se fijen límites reglamentarios para estas toxinas y no se establece por ello un método oficial para su detección, aunque sí se han desarrollado métodos como el MBA, LC-MS/MS y ensayos de fluorescencia de polarización para su detección [140].

1.2. GRUPO DE LA TETRODOTOXINA (TTX)

La tetrodotoxina es una neurotoxina asociada históricamente al pez globo. Este pez es considerado una *delicatessen* en países como Japón, a pesar de su conocido potencial tóxico. Actualmente se sabe que esta toxina no sólo se limita al pez globo, dado que se ha encontrado en gran variedad de especies de peces y otros organismos que incluyen: artrópodos, equinodermos, algas, moluscos, gusanos, tritones, ranas y sapos [155]. En Europa han sido pocos los casos de detección de TTX en moluscos bivalvos pero cada vez están siendo más frecuentes. En el año 2007 en Málaga, se dio un incidente de intoxicación alimentaria resultante de la ingestión de un gasterópodo depredador autóctono de aguas atlánticas y mediterráneas, *Charonia lampas lampas*, capturado en aguas de sur de Portugal. Aunque el paciente llegó a estar en coma, transcurridas 72 horas los síntomas revirtieron por completo y el hombre se recuperó [156]. Posteriormente, se informó de la presencia de TTX en moluscos bivalvos europeos (mejillones y ostras) cosechados entre el año 2013 y 2014. Se demostró que esta toxina está presente en aguas templadas del Reino Unido, y en los moluscos que se alimentan por filtración. Aunque las concentraciones cuantificadas fueron bajas en comparación con las dosis letales mínimas publicadas para seres humanos, dichos resultados demuestran que existe un riesgo para el consumidor [157]. En 2015 se presentó un estudio que constituye el primer informe sobre la detección de TTX en moluscos bivalvos europeos (mejillones y almejas), donde las muestras analizadas datan del período comprendido entre 2006 y 2012. Estos estudios demuestran la presencia de TTX en moluscos bivalvos en Europa. Aunque los niveles de toxinas encontrados en estas muestras fueron relativamente bajos, no se puede excluir la posibilidad de un aumento en sus concentraciones en un futuro y obviar el riesgo que supone para los consumidores [158].

➤ Estructura química y análogos

La TTX es un molécula heterocíclica, un compuesto aminoperhidroquinazolona. Se trata de una estructura muy inusual que contiene un sólo grupo guanidinio unido a un esqueleto de carbono altamente oxigenado. El esqueleto de carbono de la TTX consiste en una estructura de 2,4-dioxaadamantano con 5 grupos hidroxilo [159]. A pesar del conocimiento que hay de su alta toxicidad, la TTX no fue aislada hasta principios de los años 50 [160] y no se confirmó su estructura hasta mediados de los años 70 [161, 162] (Figura 11a).

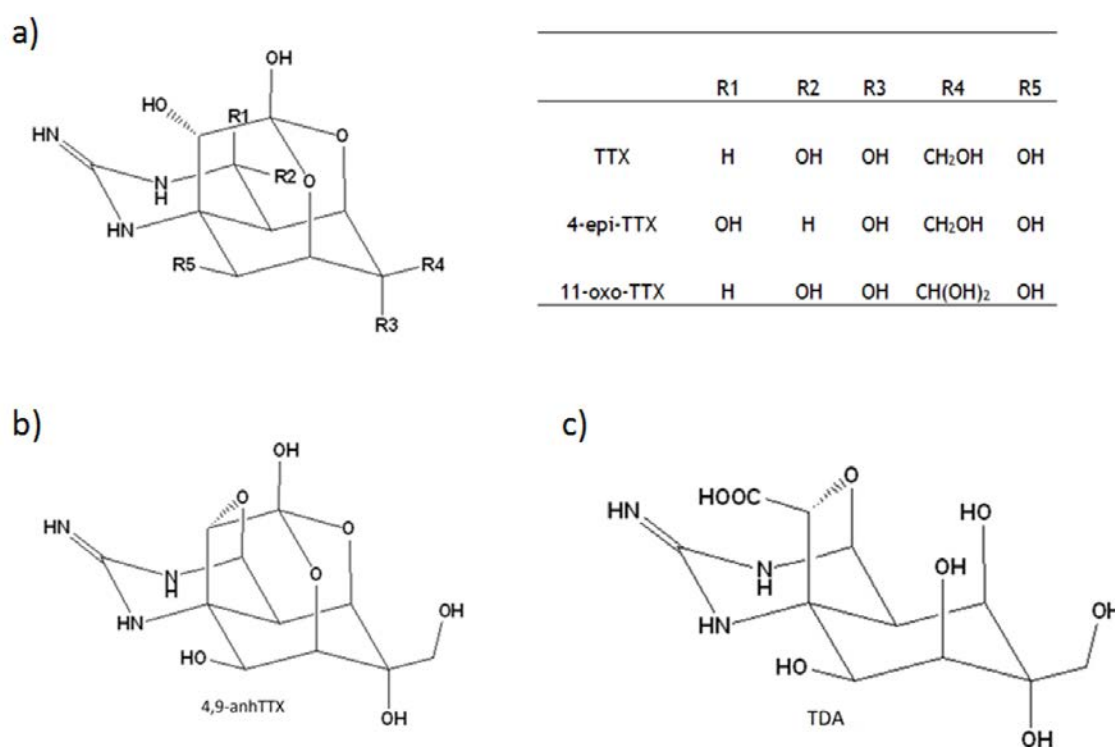


Figura 11. Estructura química: a) TTX y varios de sus análogos, b) 4,9-anhTTX y c) TDA

Hasta la fecha se han registrado 30 análogos estructurales de la TTX cuyo grado de toxicidad varía en función de la estructura [163]. Uno de los principales problemas para el estudio de estos análogos es la falta de estándares disponibles comercialmente, por lo que estos compuestos tienen que ser extraídos y aislados de las fuentes disponibles, haciendo modificaciones químicas adicionales en algunos casos. En el año 2012, cuatro nuevos análogos fueron sintetizados del tritón *Cynops ensicauda popei* [164] completando así la lista de 30 análogos estructurales, aunque muy pocos de estos compuestos están disponibles en

cantidades suficientes para permitir el desarrollo e implementación de un cribado generalizado mediante métodos analíticos cuantitativos [155].

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Esta toxina actúa bloqueando los canales de sodio: se une a la superficie externa de los canales de sodio, mediante la interacción entre el grupo guanidinio cargado positivamente en la TTX y los grupos carboxilo cargados negativamente en las cadena laterales de los canales de sodio. Afecta a la transmisión nerviosa y a la contracción muscular [165, 166]. Los organismos portadores de TTX son resistentes a sus efectos tóxicos. Esto se debe a que la proteína que conforma los canales celulares de sodio es diferente al resto de las especies, y por lo tanto se impide el bloqueo en las especies portadoras de la TTX [167].

Existen cuatro grados de intoxicación por ingesta de TTX que dependen de: la cantidad de toxina ingerida, el tiempo transcurrido tras la ingestión, el estado de hidratación de la víctima y el estado de salud general de la víctima antes de la intoxicación.

La clasificación clínica para la intoxicación por TTX se basa en los síntomas y las etapas de progresión, y a pesar de que fue descrita en el año 1941 [168], a día de hoy sigue teniendo gran valor clínico:

Grado 1: entumecimiento oral y parestesia (sensaciones anormales de cosquilleo, picazón y calor o frío), a veces acompañados de síntomas gastrointestinales (náuseas).

Grado 2: entumecimiento de la cara y otras áreas, parestesia avanzada, parálisis motora de las extremidades, incoordinación, dificultad para hablar pero con reflejos normales.

Grado 3: incoordinación muscular total, afonía, dificultad o imposibilidad para tragar, dificultad en la respiración, cianosis, disminución de la presión arterial, pupilas fijas y dilatadas, dolor intenso en el pecho. Las víctimas siguen conscientes.

Grado 4: insuficiencia respiratoria severa e hipoxia (oxigenación inadecuada), hipotensión grave (baja presión sanguínea), bradicardia (descenso de la frecuencia de contracción cardíaca a 60 latidos por minuto), arritmia cardíaca. El paciente puede estar inconsciente.

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Como ya se ha comentado, el pez globo es muy consumido en Japón a pesar de su conocida toxicidad. Debido al gran número de casos de intoxicación por TTX que tenían lugar

en este país, las autoridades japonesas se vieron obligadas a publicar una guía en el año 1983 con las especies de pez globo comestibles. Esta guía fue posteriormente actualizada en los años 1993 y 1995; además se prohibió el consumo de hígado de pez globo en restaurantes o en mercados. Aunque el número de casos ha disminuido considerablemente, todavía cada año siguen produciéndose intoxicaciones debidas principalmente al consumo de platos caseros preparados con peces silvestres que no se compran comercialmente [169]. En China y Taiwán las intoxicaciones producidas por TTX son debidas al consumo de pequeños gasterópodos. Otros casos de envenenamiento se dieron en Tailandia, Bangladesh, Malasia, Australia, India, Estados Unidos, España y la región Mediterránea (Egipto e Israel) [155].

La presencia de TTX en el pez globo es debida a una bacteria endosimbiótica que habita de forma natural en el intestino de este animal. Se cree que el pez inicialmente adquiere las bacterias productoras de TTX a través de la cadena alimentaria y que estas persisten en él. Varias bacterias ampliamente extendidas producen TTX, incluyendo algunas de los géneros *Pseudomonas spp.* y *Vibrio spp.* La existencia de esta toxina en animales terrestres, como los anfibios, se cree que es de origen exógeno, debido al consumo de estos organismos tóxicos como alimento [169].

La presencia de especies tropicales en el Mar Mediterráneo se ha triplicado durante las 3 últimas décadas, como resultado en gran parte del aumento de la temperatura del agua durante la segunda mitad del siglo XX, lo que ayuda a la supervivencia de estas especies migratorias. Desde que en 1869 se abriera el Canal de Suez, más de 300 especies acuáticas de varios grupos taxonómicos han migrado del Mar Rojo al Mar Mediterráneo. Aunque este canal permite la migración bidireccional, es esta la dirección en la que tiene lugar la migración en la gran mayoría de los casos. La entrada de especies marinas procedentes del Mar Rojo a través de este canal y que prosperan en el Mar Mediterráneo recibe el nombre de migración lessepsiana [170]. Los investigadores atribuyen la presencia de TTX en regiones europeas a este fenómeno. Las aguas de lastre también son responsables en gran parte de la transferencia de organismos que contienen estas toxinas de aguas asiáticas a aguas europeas. Junto con las aguas de lastre de los buques se transportan estas especies marinas y, cuando son expulsadas del buque para realizar la carga de mercancías, son también expulsadas dichas especies foráneas, siendo la cantidad de estas especies significativa debido al gran volumen de agua involucrado en el proceso.

➤ Límite legal y métodos de análisis

En muchas especies de pez globo, cangrejos y gasterópodos se han encontrado diferentes cantidades de toxinas PSP junto con TTX; incluso en especies susceptibles de contener TTX se ha observado la ausencia de ésta y la presencia de toxinas PSP [155]. Ambos grupos son neurotoxinas que actúan bloqueando los canales de sodio, poseen estructuras químicas semejantes y lo más importante, los síntomas por intoxicación son similares. En Europa, el grupo de toxinas PSP sí se encuentra legislado y existe tanto un límite legal establecido como métodos oficiales para su detección; sin embargo esto no ocurre para el grupo de la TTX, por lo que hay un riesgo de diagnóstico erróneo, además de ser necesario establecer límites reglamentarios adecuados que garanticen la inocuidad de los alimentos.

En la legislación Europea, existe la prohibición de comercializar peces venenosos de la familia tetraodontidae y sus derivados [171], pero esto no es suficiente para asegurar la protección de la salud de los consumidores debido a la existencia de gran número de vectores para la TTX. La EFSA ha publicado recientemente un documento sobre los riesgos para la salud pública relacionados con la presencia de esta toxina y sus análogos en bivalvos marinos y gasterópodos. Aunque no encontraron suficientes apoyos científicos para la dosis letal mínima de 2 mg para humanos, mencionada en varias revisiones, consideraron que una concentración de TTX por debajo de 44 µg TTX eq/kg de CM, no produce efectos adversos en humanos [172]

Actualmente no existe un método oficial para la detección de estas toxinas, pero sí existen varios métodos capaces de detectarla como inmunoensayos, ensayos con cultivos de neuroblastoma, ensayos hemolítico y bioensayo, siendo este último método el que tiene una aplicación más frecuente [155]. Entre los métodos químicos se encuentran los basados en HPLC-FLD y LC-MS/MS; aunque ambas técnicas permiten la detección y cuantificación individual de la TTX y sus análogos, la técnica HPLC-FLD presenta algunos inconvenientes en el uso rutinario debido a las diferencias en las intensidades de fluorescencia de algunos análogos [173]. La técnica LC-MS/MS se considera generalmente la mejor opción para la determinación de la TTX y compuestos relacionados.

1.3. GRUPO DE LA SAXITOXINA (PSP)

Este grupo de toxinas ha sido y todavía es considerado un serio riesgo para los consumidores de marisco. La saxitoxina y sus análogos son responsables de la intoxicación paralizante por consumo de moluscos, y el conjunto de toxinas que forman este grupo se denominan toxinas PSP. La primera descripción de una intoxicación PSP data de 1793 [174]. En 1927 tuvo lugar una seria intoxicación en la Bahía de San Francisco, que fue atribuida a ciertas toxinas PSP donde se observó el florecimiento de dinoflagelados responsables de esta toxicidad, siendo estos mejillones los que causaron la parálisis y la muerte a las personas que los consumieron [175]. Desde entonces son muchos los casos de intoxicación PSP por todo el mundo, responsables de envenenamientos severos de humanos que llegaron incluso a la muerte. Como se muestra en la figura 12, la incidencia de episodios tóxicos, así como la presencia de las toxinas PSP se ha incrementado y se ha reportado en lugares donde antes no eran comunes. Sin embargo, hoy en día los casos de muerte por esta causa ocurren principalmente en aquellos países donde los programas de prevención todavía no han sido adoptados.

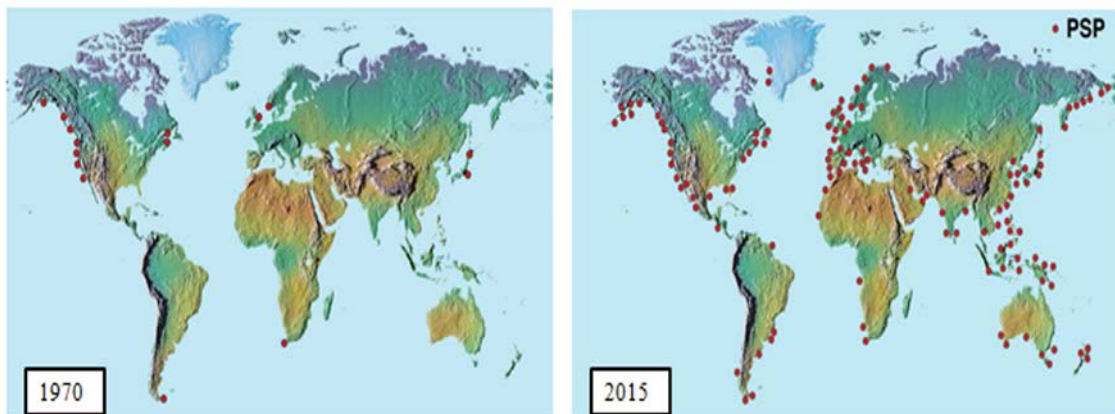


Figura 12. Distribución mundial de las toxinas PSP en los años 1970 y 2015
(Imágenes de <https://www.whoi.edu/redtide/regions/world-distribution>)

➤ Estructura química y análogos

La toxina más representativa de este grupo es la STX: fue la primera tipificada y es la más estudiada. Su nombre proviene del nombre en latín de la almeja amarilla de la cual se aisló por primera vez en el año 1957, *Saxidomus giganteus* [176]. Su alta polaridad hace que las condiciones de cristalización para esta toxina sean malas, lo que obstaculizó la aclaración de su estructura durante 18 años, hasta que en el año 1975 se consiguió resolver [177, 178]. Las toxinas PSP químicamente son tetrahidropurinas, esqueleto que comparten todos los análogos de este grupo, pero que se diferencian por las combinaciones de hidroxilos y sulfatos en cuatro posiciones de la molécula, R1-R4 (Figura 13). La STX pertenece a la gran familia de productos naturales marinos que contienen guanidinio, en concreto tiene dos grupos guanidinio responsables de su alta polaridad [179, 180].

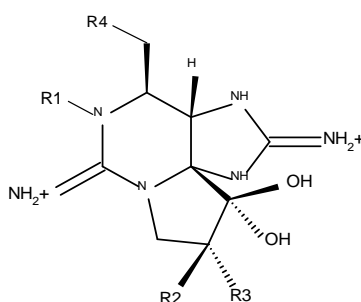
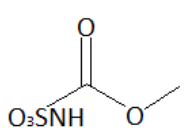
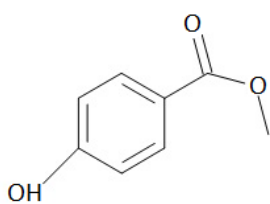


Figura 13. Estructura química de las PSP

Desde su descubrimiento inicial, se han llegado a identificar más de 50 análogos naturales de la STX [181] que difieren en el grupo lateral funcional R1, R2, R3 y R4 (Tabla 2). De acuerdo con el grupo funcional en R4 hay toxinas carbamato, decarbamoil, N-sulfocarbamoil, 13-deoxidecarbamoil e hidroxibenzoato. Las toxinas carbamato son las más tóxicas, e incluyen: STX, neosaxitoxina (neoSTX), y las gonyautoxinas 1-4 (GTX1-4). Las toxinas decarbamoil donde se incluyen: decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), decarbamoilneosaxitoxina (dcneoSTX) y decarbamoilgonyautoxinas 1-4 (dcGTX1-4), tienen toxicidad intermedia y fueron encontradas en ciertos bivalvos pero no son frecuentes en dinoflagelados tóxicos. Las toxinas N-sulfocarbamoil, donde se encuentran: GTX5-6 y C1-4, son las menos tóxicas. Las toxinas 13-deoxidecarbamoil incluyen: 13-deoxidecarbamoilsaxitoxina (doSTX) y 13-deoxidecarbamoilgonyautoxinas 2 y 3 (doGTX2 y doGTX3). Existe un quinto grupo

conocido como toxinas GC: este nuevo grupo fue identificado en cepas de *Gymnodinium* (*G.*) *catenatum* aisladas de aguas de la costa de Australia e inicialmente fueron nombradas GC1, GC2 y GC3 basándose en el fitoplancton del cual fueron aisladas [182]. Posteriormente, se descubrieron nuevos análogos de este grupo y se nombraron como GC4, GC5 y GC6 [183]. La toxicidad de estos compuestos no se conoce bien hasta el momento, sin embargo han sido identificadas en cepas de *G. catenatum* aisladas en Portugal, España, China, Japón y Uruguay [184], quedando así demostrada su extensión a nivel mundial.

Tabla 2. Estructura molecular de los principales análogos de la STX

	R1	R2	R3	R4
Carbamato	STX	H	H	H
	GTX2	H	H	OSO ₃
	GTX3	H	OSO ₃	H
	neoSTX	OH	H	H
	GTX1	OH	H	OSO ₃
	GTX4	OH	OSO ₃	H
N-sulfo-carbamoil	GTX5	H	H	H
	C1	H	H	OSO ₃
	C2	H	OSO ₃	H
	GTX6	OH	H	H
	C3	OH	H	OSO ₃
	C4	OH	OSO ₃	H
				
Decarbamoil	dcSTX	H	H	H
	dcGTX2	H	H	OSO ₃
	dcGTX3	H	OSO ₃	H
	dcneoSTX	OH	H	H
	dcGTX1	OH	H	OSO ₃
	dcGTX4	OH	OSO ₃	H
				OH ⁻
13-deoxidecarbamoil	doSTX	H	H	H
	doGTX2	H	OSO ₃	H
	doGTX3	H	H	OSO ₃
				CH ₃
Hidroxi-benzoato	GC1	H	H	OSO ₃
	GC2	H	OSO ₃	H
	GC3	H	H	H
	GC4	OH	H	OSO ₃
	GC5	OH	OSO ₃	H
	GC6	OH	H	H
				

➤ Mecanismo de acción y síntomas de intoxicación

Los canales de sodio dependientes del voltaje son las dianas moleculares de estas neurotoxinas. Las toxinas PSP se consideran agentes de bloqueo que reducen el número de canales de sodio conductores, se unen al sitio 1 de estos canales con alta afinidad, inhibiendo temporalmente la permeabilidad de los iones sodio a los que se unen firmemente (Figura 14). Esto impide que dichos iones pasen a través de las membranas de las células nerviosas, provocando interferencias en la transmisión de señales a lo largo de los nervios. El bloqueo generalizado resultante impide la generación de impulsos en los nervios periféricos y en los músculos esqueléticos [185].

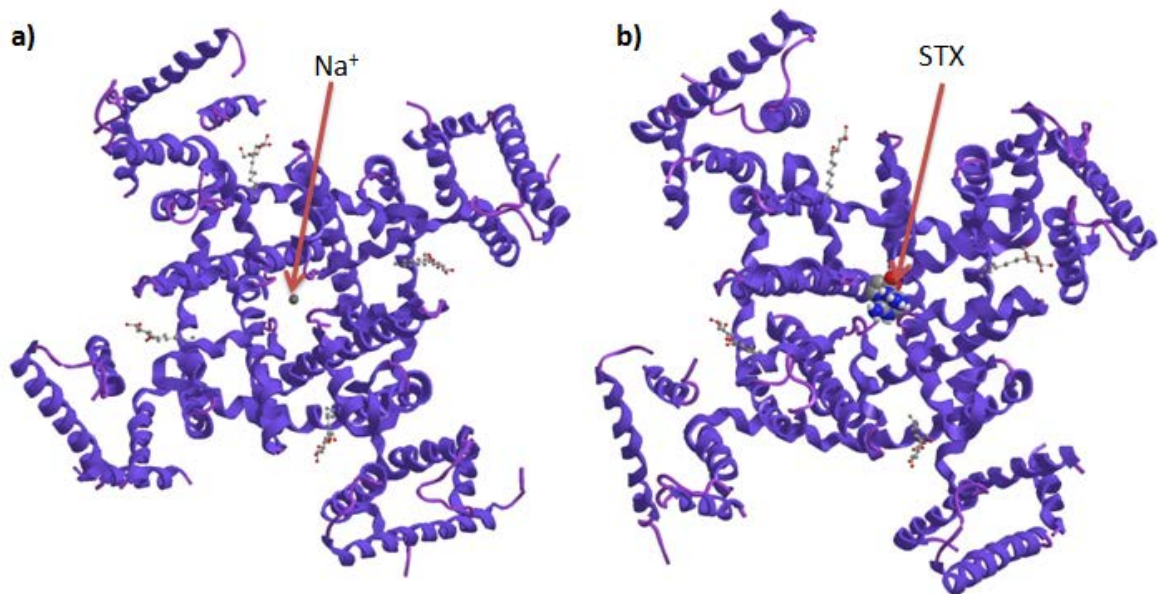


Figura 14. Simulación de la interacción de la STX con los canales de sodio dependientes del voltaje: a) canal de sodio, b) bloqueo del canal de sodio por la STX. Como modelos del canal de sodio se tomó la estructura cristalina Na_vRh [186]

Los síntomas de la intoxicación PSP incluyen: sensación de hormigueo en labios, boca y lengua, entumecimiento de las extremidades, sensación anormal de cosquilleo, calor y frío (parestesia), debilidad muscular, dificultad para coordinar movimientos (ataxia), náuseas, dificultad para respirar, mareos, vómitos, dolor de cabeza, dificultad para tragar (disfagia) y para articular sonidos y palabras (disartria) [174]. También se ha observado hipertensión

sistólica/diastólica en casi todos los pacientes [187]. Los síntomas ocurren generalmente a los 30 minutos de consumir el marisco contaminado, aunque si la concentración de toxina presente en el molusco es lo suficientemente elevada estos síntomas pueden manifestarse a los pocos minutos de la ingestión [188]. Se han reportado casos de muerte por envenenamiento PSP, en un tiempo de 3-4 horas tras el consumo de moluscos contaminados [189]. Es importante señalar que no hay un tratamiento específico para esta intoxicación y tampoco existen antídotos aprobados para el tratamiento en humanos [190]. El tratamiento sintomático durante la fase inicial es crucial para la recuperación posterior del paciente, puesto que la intoxicación PSP es una amenaza de riesgo para la vida; sin embargo, el diagnóstico precoz puede atribuir los síntomas a otras causas como la intoxicación por abuso de drogas, trastornos psiquiátricos o accidentes cerebrovasculares [191, 192]. El tratamiento médico existente consiste en realizar intubación al paciente, evacuación del contenido estomacal y terapia de fluidos para facilitar la excreción de la toxina, además de apoyo respiratorio mediante respiración asistida. El uso de diuréticos y monitorización de los parámetros cardiovasculares es importante, ya que se han encontrado casos de hipertensión y taquicardia [192, 193]. Para los pacientes que logran sobrevivir 24 horas, ya sea con o sin respiración asistida, el pronóstico es considerado bueno [194]. En casos fatales, la muerte se produce por asfixia [174]. Los niveles de toxicidad que han dado lugar a casos de enfermedad y muerte por envenenamiento PSP son muy variables y parecen depender principalmente de las diferencias en la sensibilidad que presenta cada individuo. Desde la implantación de programas de monitoreo en muchos países afectados por eventos tóxicos de toxinas PSP, se han logrado minimizar los riesgos para la salud de los consumidores de moluscos y se han reducido considerablemente los casos de intoxicación y muerte [174].

➤ Vectores, productores y distribución geográfica

Las toxinas PSP son producidas por dinoflagelados marinos de los géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium*. Más específicamente, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium fundyense*, *Alexandrium catenella*, *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense* son los responsables de la mayoría de los casos de intoxicación PSP reportados (Figura 15) [195, 196].

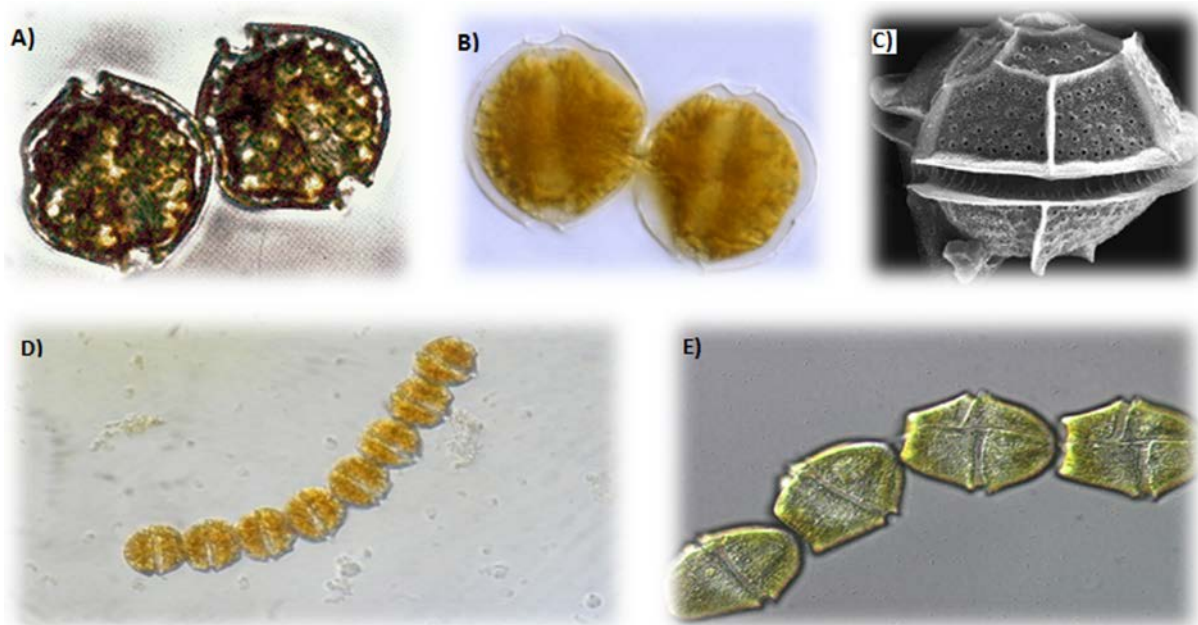


Figura 15. Principales productores marinos de toxinas PSP: A) *Alexandrium tamarense*, B) *Alexandrium fundyense*, C) *Pyrodinium bahamense*, D) *Alexandrium catenella*, E) *Pyrodinium bahamense*

Existen también numerosos informes sobre la producción de estas toxinas por organismos procariotas presentes en aguas dulces (Figura 16), tales como las cianobacterias filamentosas, que incluyen *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon gracile*, *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Lyngbya wollei* [197]. Las floraciones de estas cianobacterias han sido las responsables de casos de intoxicación de poblaciones vivas y de la contaminación de embalses de agua dulce [198]. El subgrupo de toxinas GC de descubrimiento más reciente son producidas por cepas de *G. catenatum* [184] de naturaleza globalmente extendida.

También han sido propuestos como productores de toxinas PSP algunas bacterias: existen estudios donde se demuestra que las bacterias pueden por lo menos desempeñar un papel en la producción de dinoflagelados productores a su vez de estas toxinas [199, 200].

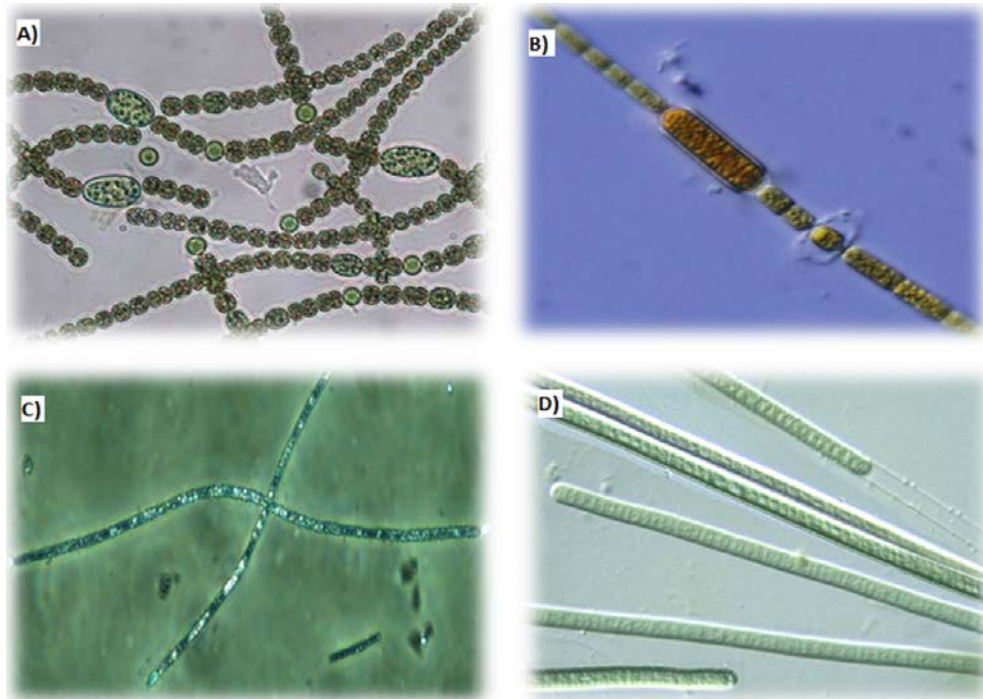


Figura 16. Principales cianobacterias productoras de toxinas PSP: A) *Anabaena circinalis*, B) *Aphanizomenon gracile*, C) *Cyndrospermopsis raciborskii*, D) *Lyngbya wollei*

La vía tradicional de inserción de las toxinas PSP en la cadena alimentaria implica la ingestión y concentración de dinoflagelados tóxicos por parte de los moluscos que se alimentan por filtración, en particular los bivalvos [195]. La mayoría de los seres humanos que experimentan intoxicación PSP han consumido bivalvos tóxicos [195], pero también ocasionalmente vectores no tradicionales tales como gasterópodos y crustáceos [196], y rara vez han estado implicados peces [201]. Los bivalvos retienen las toxinas PSP durante largos períodos de tiempo, siendo algunas especies capaces de depurar las toxinas rápidamente mientras que otras son más lentas. La mayoría de las especies pueden eliminar las toxinas en semanas [195, 196] mientras que otras como las almejas (*S. solidissima*, *S. gigantea*) y las vieiras (*P. magellanicus*) retienen altos niveles de toxinas durante largos períodos de tiempo, desde meses hasta más de cinco años [202, 203]. Los perfiles de toxina de los bivalvos tóxicos, y por lo tanto el riesgo para el consumidor, varían dependiendo de la especie de dinoflagelado a la que los moluscos estén expuestos, por ejemplo, aquellos bivalvos expuestos a *A. tamarensis* y *A. catenella* acumulan altos niveles de gonyautoxinas, mientras los que se

encuentran expuestos a *P. bahamense* y *G. catenatum* acumulan niveles muy bajos de este tipo de toxinas [204]. La región geográfica, la estación y la distribución de los componentes tóxicos en los diferentes tejidos también son factores determinantes del perfil tóxico del bivalvo, siendo ésto de vital importancia en el caso de las vieiras puesto que las toxinas se concentran en la glándula digestiva (concretamente en el hepatopáncreas) y no se acumulan fácilmente en su músculo aductor que es la parte consumible, por lo que suelen considerarse seguras para el consumo público incluso en presencia de algas tóxicas [202]. El conocimiento de qué toxinas se depositan en qué tejidos y cómo éstas se transforman dentro del bivalvo y a lo largo de la cadena alimentaria, es crítico para determinar el riesgo de salud pública derivado de su consumo. Se conoce la capacidad de los bivalvos de biotransformar las toxinas N-sulfocarbamoil, que son las menos potentes, en su análogos carbamato más tóxicos [205].

Aunque los moluscos que se alimentan por filtración son los vectores tradicionales de este grupo de toxinas, con mejillones y almejas como dominantes, existe un incremento de vectores considerados no tradicionales. Dentro de este grupo se incluyen gasterópodos marinos (carnívoros y herbívoros) principalmente el caracol y oreja de mar [196, 206], crustáceos como cangrejos y langostas [207] y ciertas especies de peces tales como salmón [208], arenque [209] y caballa [210]. Como se explicó anteriormente, las toxinas PSP también pueden acumularse en ciertas especies de pez globo [155].

Los eventos de toxinas PSP representan un impacto económico para la industria del marisco en todo el mundo, los casos encontrados se presentan en Europa, África, América, Asia y Oceanía [174]. En Australia, Nueva Zelanda y Brasil, las toxinas PSP afectan a aguas potables [190].

1.3.1. Métodos de análisis

➤ Bioensayo

El MBA modificado por la AOAC es considerado el método regulatorio en muchos países [26]. El tiempo transcurrido desde la inyección intraperitoneal del extracto ácido de los tejidos de molusco a ratones de 20 g hasta la muerte del animal, es usado en dicho método para estimar la cantidad de toxina presente en los moluscos, con un límite de detección de 40 µg STX eq/ 100 g (Figura 17). A pesar de ser usado en todo el mundo, presenta una serie de desventajas entre las que se incluyen: pobre especificidad, baja sensibilidad, bajo rendimiento

por muestra, un coste considerable, su aplicación requiere de trabajo muy laborioso y presenta alta variabilidad de los resultados [174, 211, 212]. El MBA reporta poca información sobre el perfil de toxinas, aunque es capaz de informar sobre la toxicidad total de la muestra. Todo esto sumado a las presiones éticas sobre el uso de animales en investigación ha hecho que se planteen métodos analíticos alternativos [213, 214].



Figura 17. Esquema del método MBA, AOAC 2005

➤ Métodos basados en unión a receptor (RBA)

Existen numerosos ensayos que actualmente están siendo utilizados para garantizar la seguridad de los moluscos y la salud humana. Los métodos basados en ensayos de unión a

receptores se desarrollan usando dianas biológicas de las toxinas marinas. El primer método basado en esta técnica se desarrolló a principios de los 90 [215]; después de un refinamiento extensivo fue aceptado como método oficial de análisis por la AOAC en 2011 [216]. Este ensayo es altamente específico, dado que aprovecha la interacción de las toxinas con sus receptores, como los canales de sodio. Previo a la aceptación de este método por la AOAC, varios estudios habían demostrado la posibilidad de usar RBA para detectar toxinas PSP en matrices de interés como el plasma humano [217] y extractos de mejillón [215]. El rendimiento y la eficiencia en el análisis de las muestras habían sido mejorados [218], y los resultados obtenidos mostraban gran concordancia con el MBA. Una reducción del tiempo de ensayo a 4 horas y la introducción de nuevas matrices como algas, zooplancton y fluidos humanos fueron otros de los avances conseguidos; además la correlación de los resultados con los obtenidos por HPLC en extractos de alga, orina humana y muestras de suero fue muy alta [219]. Todas estas mejoras pusieron de manifiesto la capacidad de RBA de proporcionar estimaciones precisas de la toxicidad global de las muestras, obteniendo resultados que concordaban bien con los demás métodos establecidos para el análisis de las PSP en moluscos [174]. Sin embargo, la principal limitación para su implementación fue la necesidad de utilizar materiales radioactivos marcados (^3H -STX). Este material además de ser escaso, también hace difícil para algunos laboratorios el poder cumplir los requerimientos necesarios para la ejecución de dichos ensayos [174].

➤ Ensayo por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA)

Los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas son un tipo de ensayo bioquímico que utiliza anticuerpos que se unen al analito de interés. Se han establecido una serie de ensayos para la saxitoxina y varios de sus análogos que pueden desarrollarse como ensayos competitivos o directos, con anticuerpos policlonales y monoclonales [220]. Como la técnica ELISA ha sido bien desarrollada a lo largo de los años, están disponibles varios kits comerciales que ofrecen importantes ventajas, como su fácil uso y alto rendimiento [174]. Se encontró una buena correlación entre ELISA y MBA en algunos estudios [221, 222] pero no existe unanimidad [223]. Como ya se ha explicado, el perfil de toxinas puede llegar a ser complicado, por lo que una de las preocupaciones con esta técnica es la reactividad cruzada dentro de los diferentes derivados, que se da cuando un mismo anticuerpo es capaz de reconocer distintos analitos presentes en la muestra. No se considera un obstáculo si la

reactividad cruzada se correlaciona con la toxicidad, por ejemplo las toxinas C tienen baja reactividad cruzada, pero también baja toxicidad, y por lo tanto el resultados del ensayo puede indicarnos la toxicidad real. Sin embargo, este no es el caso de las variantes altamente tóxicas como GTX1, GTX4 y NEO que exhiben pobre reactividad cruzada en algunos ensayos [224]. Además, el número de falsos positivos encontrados con esta técnica es muy elevado. Debido a estas preocupaciones, se recomienda que los métodos ELISA se utilicen como herramientas de detección en lugar de como ensayos de cuantificación [225].

➤ Resonancia de plasmón superficial (SPR)

La resonancia de plasmón superficial ha sido ampliamente utilizada en investigación biomédica y en la industria. Esta técnica ha sido evaluada para la detección e investigación de toxinas de pequeño peso molecular. Se ha desarrollado un método con SPR en el año 2007 para detectar toxinas PSP usando la unión a anticuerpos de tipo inhibidor [226]. El rendimiento de este ensayo en muestras reales sugirió que esta tecnología podría ser útil como un ensayo de detección para este grupo de toxinas. Posteriormente se llevó a cabo un estudio de validación [227] donde se mostró que el método presentaba altas correlaciones en los resultados obtenidos del análisis de muestras reales, en comparación con los métodos de la AOAC: MBA y HPLC. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran: la preparación de la muestra no es tan laboriosa como en otros métodos, no requiere ninguna identificación de los componentes que interactúan, las interacciones se miden en tiempo real con un tiempo de análisis de minutos, por lo tanto la velocidad de análisis y los bajos costes del biosensor lo hacen muy adecuado para la detección de toxinas [174]. Sin embargo, el desarrollo de esta técnica se ha centrado en pruebas con moluscos y los límites de detección todavía no son adecuados para la detección de toxinas PSP en agua potable. Además, cuando se utilizan anticuerpos, las mismas preocupaciones con respecto a la reactividad cruzada que limitan la utilidad de los métodos ELISA también se aplican a esta tecnología [225].

Todas estas técnicas descritas no permiten estudiar el perfil tóxico y pueden aparecer problemas al analizar muestras muy complejas; es por ello que se han desarrollado métodos analíticos que permiten la separación de los distintos análogos, haciendo así que puedan ser identificados y cuantificados. Por lo tanto, estos métodos ofrecen la ventaja de dar a conocer el perfil tóxico de las muestras además de su toxicidad total.

➤ HPLC-FLD

Los métodos basados en HPLC-FLD son los que mejor establecidos se encuentran hasta la fecha para la detección de las toxinas PSP. Debido a que la STX y sus análogos no contienen un cromóforo natural sensible a la absorción de luz ultravioleta, estos métodos, que empezaron a ser desarrollados ya en los años 70 [228], consisten en obtener un compuesto fluorescente a través de una reacción de oxidación [229-232]. Esta reacción de oxidación puede tener lugar tanto pre- como post-columna; sin embargo, la instrumentación necesaria, procesamiento de las muestras y los exigencias de los resultados cromatográficos son diferentes en los dos enfoques.

El método HPLC-FLD con oxidación pre-columna (PreCOX), también conocido como "método de Lawrence" [233], tras su aceptación como método oficial de la AOAC [234] ha llegado a ser el método más establecido, sobre todo como herramienta regulatoria, debido a su implementación como única alternativa legislada al MBA [214]. Las toxinas son extraídas de la carne de molusco homogeneizada mediante extracción por duplicado usando ácido acético como disolvente y purificadas mediante extracción en fase sólida. Para la conversión de las PSP en purinas se emplea peróxido de hidrógeno y/o peryodato sódico en medio alcalino. Los productos resultantes de la reacción de oxidación son separados por HPLC en fase reversa (Figura 18). Es aplicable para la determinación de STX, neoSTX, dcSTX, GTX2,3, GTX1,4, GTX5, C1,2 y C3,4 en matrices de mejillón, almeja, vieira y ostra. Este método ha sufrido varias modificaciones para incluir nuevas toxinas, dcNEO [235], dcGTX2,3 [235, 236] y GTX6 [237], y para mejorar su aplicación en matrices concretas y de gran interés comercial [235, 238].

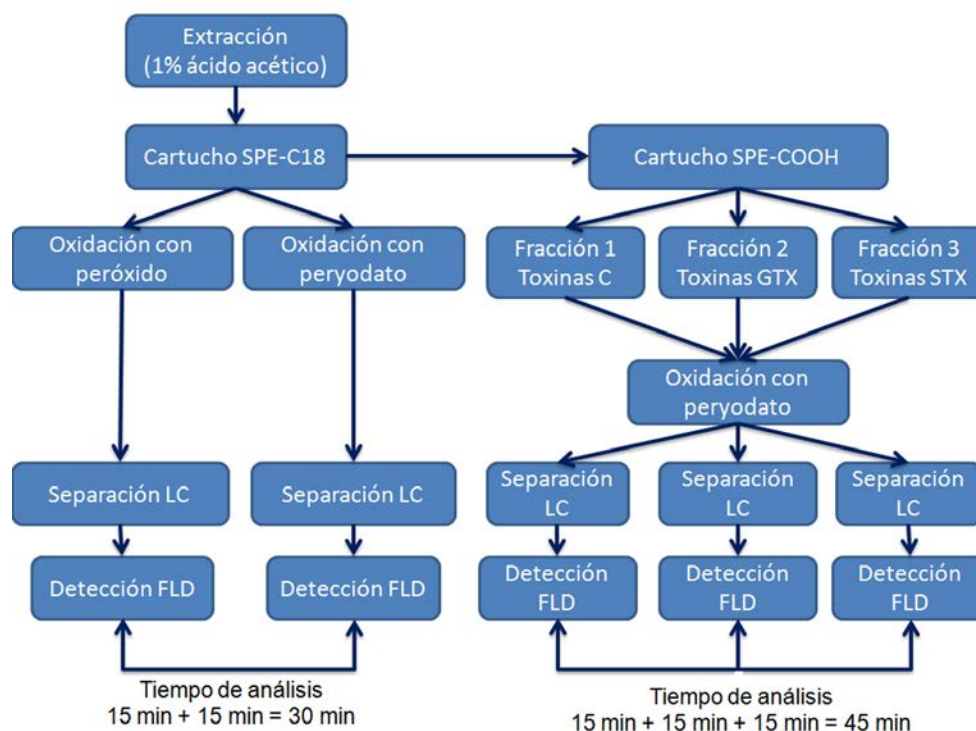


Figura 18. Diagrama esquemático del método HPLC-FLD con oxidación pre-columna, AOAC 2005.06

Hoy en día es utilizado rutinariamente en laboratorios de Reino Unido, Irlanda, Portugal y Nueva Zelanda lo que demuestra que es un método adecuado para su propósito [239]. Es una herramienta eficaz para controles oficiales de monitoreo que muestra un alto rendimiento; sólo las muestras que contienen un perfil de toxinas PSP complejo necesitan ser sometidas al proceso completo de preparación previo a su análisis. El tipo de columna empleado muestra una excelente vida útil y la cromatografía obtenida es muy robusta. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes: no es capaz de separar pares de epímeros, cuya toxicidad es diferente, lo que implica una sobreestimación de la toxicidad total de las muestras al emplear el factor de toxicidad más elevado de ambos análogos; la preparación de las muestras, si el perfil tóxico es complejo, consume mucho tiempo, elevado gasto en material y necesidad de personal altamente cualificado para la interpretación de los resultados, puesto que la cromatografía no es sencilla [240]. En la tabla 3 se muestra cada toxina y el número de productos de oxidación que se obtienen. Además también se señalan las toxinas que aparecen a los mismos tiempos de retención. Aunque es probable que el mayor inconveniente y la principal razón para que el método de Lawrence no sea implementado a nivel mundial como instrumento regulador es el tiempo necesario para completar el análisis de cada muestra [241].

Tabla 3. Productos de oxidación método HPLC-FLD con oxidación pre-columna

TOXINAS	NÚMERO DE PRODUCTOS DE OXIDACIÓN		INTENSIDAD		PRODUCTOS DE OXIDACIÓN OBTENIDOS CON EL MISMO TIEMPO DE RETENCIÓN	
	PERÓXIDO	PERYODATO	PERÓXIDO	PERYODATO	PERÓXIDO	PERYODATO
STX	UNO	UNO	++	+	NEO	NEO
dcSTX	PRIMERO	PRIMERO	++	-		dcNEO
	SEGUNDO	SEGUNDO	+	+	dcNEO	NEO, GTX6, dcNEO
NEO	NO	PRIMERO	--	+		GTX6
	SEGUNDO	SEGUNDO	-	++	dcSTX	GTX6
	TERCERO	TERCERO	-	+		dcSTX
C1,2	UNO	UNO	++	+		
C3,4	NO	PRIMERO	--	+		GTX1,4
	NO	SEGUNDO	--	++		GTX1,4; dcGTX2,3
	NO	TERCERO	--	+		GTX1,4; GTX2,3
GTX1,4	NO	PRIMERO	--	+		C3,4
	NO	SEGUNDO	--	++		C3,4; dcGTX2,3
	TERCERO	TERCERO	-	++	GTX2,3	C3,4
GTX2,3	UNO	UNO	++	++	GTX1,4	C3,4; GTX1,4
GTX5	UNO	UNO	++	-		
GTX6	NO	PRIMERO	--	+		NEO
	NO	SEGUNDO	--	++		NEO, dcSTX, dcNEO
	NO	TERCERO	--	-		NEO, STX
dcGTX2,3	PRIMERO	PRIMERO	++	+		
	SEGUNDO	SEGUNDO	+	++		C3,4; GTX1,4
dcNEO	PRIMERO	PRIMERO	--	++		dcSTX
	SEGUNDO	SEGUNDO	-	+	dcSTX	dcSTX, NEO, GTX6

INTENSIDAD: -- NO VISIBLE, - MUY BAJA, + BAJA, ++ ALTA

Una alternativa al método de Lawrence son los métodos HPLC-FLD con oxidación post-columna (PCOX) que separan la toxinas antes de su transformación en compuestos fluorescentes. Se basan en la separación de las toxinas PSP sin oxidar; una vez que eluyen de la columna se mezclan con el oxidante antes de que atraviesen una bobina de reacción donde tiene lugar la oxidación. A la salida de esta bobina, a la mezcla se le añade un ácido fuerte que detiene la reacción y genera la formación de productos estables de oxidación para cada toxina que posteriormente serán analizados por FLD. Aunque existen métodos descritos previamente [242], el método más innovador llegó en el año 1987, donde se describen tres etapas para analizar el rango completo de toxinas PSP conocidas hasta esa fecha [243].

Para ello fue necesario el empleo de tres fases móviles en isocrático y tres análisis separados de la muestra, específicamente para (1) grupo de toxinas C, (2) toxinas GTX y (3) neoSTX, STX y dcSTX. Mejoras posteriores en el método lograron analizar las GTX, neoSTX, STX y dcSTX juntas y separarlas en una nueva columna mediante el empleo de un gradiente de elución, aunque la resolución de las toxinas del grupo GTX no fue la deseada [244-246]. Fue en el año 1995 cuando se publicó el método de Oshima [229], que se basa en los trabajos HPLC-FLD con oxidación post-columna publicados hasta la fecha, con modificaciones que lograron mejorar las carencias de los métodos previos. Ha sido sometido a continuas modificaciones [247, 248], ampliamente utilizado extraoficialmente a nivel mundial e incluso establecido como herramienta de control en países como Noruega [249].

Este método [229, 247] supuso la base de lo que hoy en día se conoce como método PCOX. Fue inicialmente descrito en el año 2008 [230], sometido a validaciones en 2009 [250] y 2011 [251], hasta que finalmente fue adoptado como método oficial de la AOAC [252]. En este caso las toxinas son extraídas de la carne de molusco homogeneizada usando como disolvente ácido clorhídrico diluido y calentamiento, al igual que en el caso del MBA [29]; son purificadas mediante el uso de filtros de jeringa y la extracción en fase sólida [229] es sustituida por la desproteínización del extracto usando ácido tricloroacético (TCA) [230]. Se usan 2 columnas distintas para la separación de las PSP. El análisis por HPLC en columna C18 con gradiente se utiliza con una disolución tampón de heptano sulfonato de sodio y ácido fosfórico para el análisis de las GTXs y STXs (GTX1-5, dcGTX2, dcGTX3, neoSTX, STX y dcSTX), y las toxinas C (C1-4) se separan en una columna C8 mediante gradiente utilizando una disolución tampón de tetrabutilamonio fosfato [250, 251]. Las toxinas son derivatizadas por medio de una oxidación post-columna a 85 °C mediante el uso de una disolución tampón

de ácido fosfórico y peryódico. El efluente oxidado es acidificado utilizando ácido nítrico, y los derivatizados son detectados por fluorescencia. El método es aplicable para la determinación individual de STX, neoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX1-GTX5 y C1-C4 en moluscos bivalvos (mejillón, almeja, vieira y ostra) [253] (Figura 19).

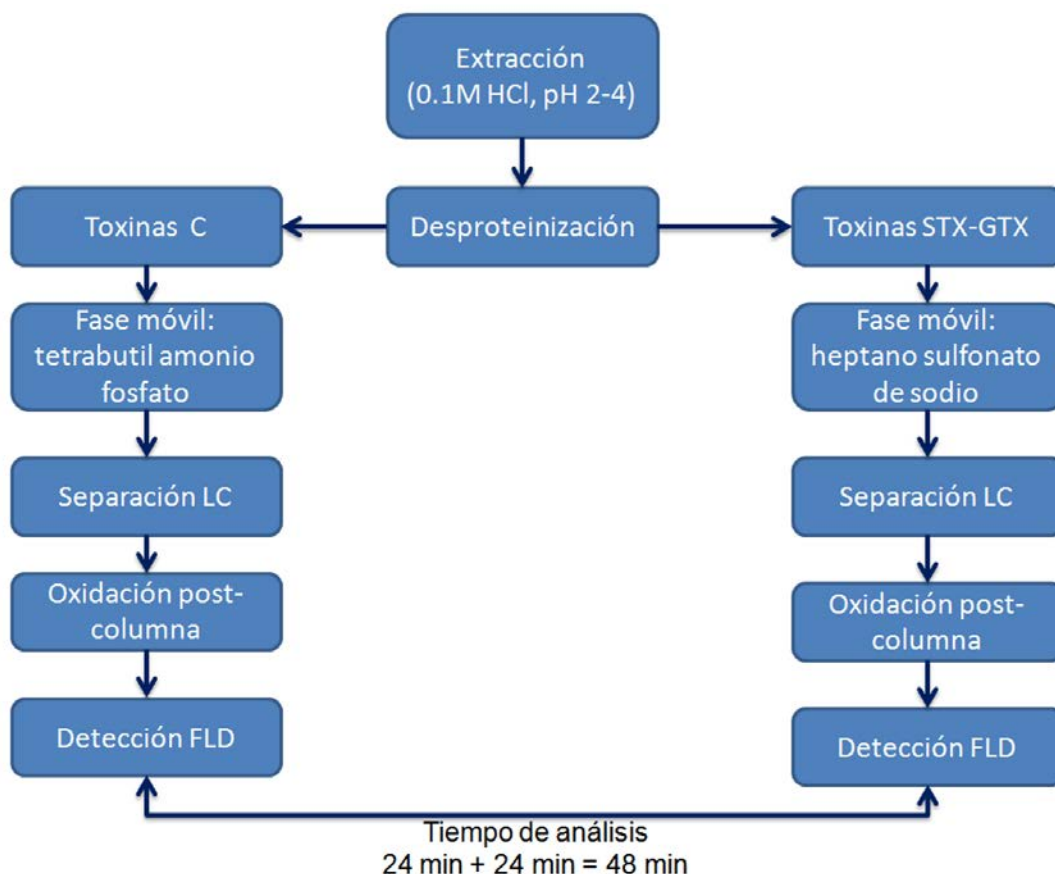


Figura 19. Diagrama esquemático del método HPLC-FLD con oxidación post-columna, AOAC 2011.12

El método de Oshima [229] requería de 3 inyecciones en isocrático para la cuantificación de 14 toxinas. Aunque el número de inyecciones fue reducido a 2 en posteriores modificaciones [247], para la separación de las GTXs y STXs era necesario un tiempo de análisis de 60 minutos y el empleo de un sistema de 3 fases móviles distintas. Con el método PCOX, las GTXs y STXs pueden separarse en un sólo paso mediante el empleo de una fase móvil en gradiente, lo que permite reducir el tiempo de análisis a 24 minutos. Todas las

toxinas estudiadas se resuelven bien de la línea base con la excepción de GTX5, que fue resuelta sólo un 50% y STX y dcSTX que se resuelven entre sí un 70%.

Las principales diferencias entre este nuevo método y el método de Oshima son: diferente procedimiento de limpieza de las muestras, diferente concentración de tetrabutilamonio fosfato y empleo de gradiente, distintas columnas y diferentes condiciones de oxidación. Las 14 toxinas PSP para las cuales existen estándares comerciales disponibles son incluidas en el método PCOX; sólo una toxina adicional para la cual también existe estándar comercial no fue incluida, se trata de la dcNEO. En las condiciones de trabajo de PCOX la dcNEO coeluye con la NEO, y para resolverlas sería necesario aplicar un gradiente de 75 minutos [247]. Desde el punto de vista regulatorio esto no supone un problema importante ya que la toxicidad relativa de dcNEO es menor que la de NEO, por lo tanto el único problema sería una ligera sobreestimación de la toxicidad total de la muestra, lo que protegería al consumidor aún más.

El método PCOX teóricamente proporciona resultados más precisos en términos de toxicidad y perfil de toxinas y también es menos laborioso tanto a la hora de preparar las muestras para el análisis como para la interpretación de los resultados [239].

Estos métodos analíticos han sido a menudo comparados con el MBA, y la mayoría de las publicaciones han mostrado una buena correlación entre HPLC-FLD y MBA, con estudios llevados a cabo en un rango de especies marinas que incluyen una gama de diferentes géneros de mejillones, almejas, vieiras y ostras [233, 235, 254, 255]. Por lo tanto los métodos HPLC-FLD han demostrado su capacidad como posibles alternativas al MBA. Actualmente, en la UE el límite máximo permitido de estas toxinas en moluscos destinados a consumo humano es de 800 µg STX equivalentes/ kg de carne de molusco (cuerpo entero o partes comestibles) [53].

➤ LC-MS/MS

Por otra parte, en los últimos años se han logrado grandes avances en el desarrollo de métodos que utilizan LC-MS/MS para la separación de toxinas PSP, aunque actualmente su aplicación en programas de monitoreo todavía se encuentra en una fase temprana.

La publicación en el año 2005 de un método basado en la cromatografía líquida hidrófila (HILIC) combinada con MS/MS [256], que mostró mayor sensibilidad que los métodos

previos publicados hasta ese momento [257, 258], supuso un punto de inflexión en el uso de esta técnica para la detección de toxinas PSP.

Diener y col. llevaron a cabo un nuevo estudio sobre HILIC en el año 2007 [259]. Con esta nueva modificación del método la separación de varios análogos era mejor que la que se mostraba en el método publicado por Dell'Aversano y col. [256]. Además, también consiguieron tiempos de retención más estables para todas las toxinas en varias matrices como mejillones y algas (*Alexandrium catenella*). Aunque los autores sugirieron que era viable su aplicación en análisis rutinarios, era necesario todavía un tiempo de 40 minutos para la detección de estas toxinas. Ésto dificultó su implementación en programas de control rutinarios, que requieren resultados en tiempos de análisis cortos. Otros autores han reportado diferentes métodos HILIC-MS/MS para la detección de toxinas PSP, aunque la sensibilidad, recuperación de los analitos, y la estabilidad de los tiempos de retención eran los principales problemas que se encontraron debido al efecto significativo que tiene la matriz [174]. El gran número de picos que interfieren en los cromatogramas cuando los extractos son analizados con LC-MS/MS, sugirió la necesidad de llevar a cabo un proceso de limpieza de las muestras previo a su análisis, con el fin de eliminar las sales o los picos que interfieren en la identificación de las toxinas. Varios autores han investigado diferentes procesos de limpieza de muestras, tales como la extracción en fase sólida (SPE) [260, 261]. Recientemente se ha propuesto un nuevo proceso de limpieza de las muestras basado en el uso de cartuchos de carbono grafitizado (PGC) (Figura 20), que mostró muy buenos resultados en términos de sensibilidad, selectividad y rapidez para el análisis de las toxinas PSP en gran variedad de muestras [262].

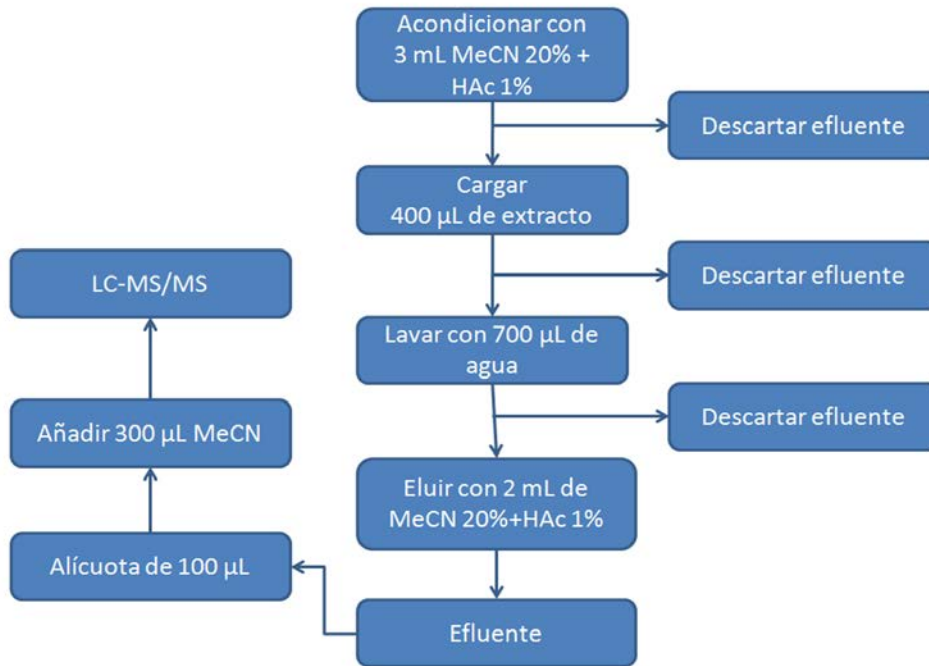


Figura 20. Diagrama del proceso de limpieza mediante SPE de carbono grafitizado [262]

A la vista de los avances logrados en los últimos años, esta área de investigación se está expandiendo rápidamente y promete ser una herramienta efectiva para la detección de toxinas PSP [174], puesto que su mayor ventaja es que los métodos LC-MS/MS son métodos confirmatorios.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Debido al incremento tanto en intensidad como en frecuencia de las floraciones de algas nocivas, se han establecido programas de monitorización de toxinas marinas en las costas de todo el mundo. Para ello es necesario disponer de métodos que permitan la cuantificación de dichas toxinas, que sean rápidos, eficaces, que garanticen bajos límites de detección y sobre todo que sean capaces de proteger la salud de los consumidores. Por lo tanto el objetivo de la presente Tesis Doctoral es por una parte estudiar los métodos existentes para la detección de toxinas PSP y proponer mejoras, y por otra parte proporcionar métodos alternativos que resuelvan las carencias de los métodos ya existentes. Los objetivos específicos son:

1. Estudiar la influencia de diferentes matrices reales de moluscos, equinodermos y gasterópodos en la separación de las toxinas PSP, cuando se utiliza como método de análisis el método PCOX y optimizar dicho método para las matrices estudiadas.
2. Evaluar los métodos cromatográficos con detección fluorimétrica validados por la AOAC, con derivatización pre-columna y post-columna, en la identificación y cuantificación de toxinas PSP.
3. Poner a punto un método de cromatografía líquida con detección fluorimétrica y oxidación post-columna, empleando una columna de carbón grafitizado poroso, para el análisis simultáneo de toxinas PSP y TTX.
4. Poner a punto un método LC-MS/MS para el análisis de toxinas PSP y TTXs, utilizando una columna de carbón grafitizado poroso.

3.PUBLICACIONES

3. PUBLICACIONES

Esta sección recoge la metodología empleada en la realización de los experimentos, los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral y las discusiones correspondientes a cada bloque de resultados.

El conjunto de datos se encuentra recogido en cinco artículos. Para su presentación se subdividen en un primer bloque correspondiente a las mejoras en los procedimientos de detección y cuantificación para el análisis de toxinas PSP; y un segundo bloque que recoge los resultados en la innovación de los procedimientos de detección y cuantificación en el análisis de toxinas PSP y TTXs, simultáneamente.

3.1. BLOQUE I: MEJORA EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS PSP.

Artículo 1. Influence of different shellfish matrices on the separation of PSP toxins using a postcolumn oxidation liquid chromatography method. Verónica Rey, Amparo Alfonso, Luis M. Botana y Ana M. Botana. Publicado el 15 de abril de 2015 en *Toxins* 7(4):1324-40, doi:10.3390/toxins7041324.

En este artículo se estudió la separación de las PSP empleando para su análisis el método PCOX. Se estudiaron diferentes matrices reales de molusco (mejillón, vieira, almeja y ostra). La separación de las toxinas PSP depende de varios factores, y es crucial tener en cuenta la presencia de picos de matriz interferentes para llevar a cabo una buena separación y una correcta identificación. Los picos de matriz no siempre son iguales, lo que es una cuestión importante cuando se trata de obtener resultados buenos y fiables con respecto a la resolución y a la información sobre toxicidad. Se propuso que la separación debería realizarse considerando el tipo de matriz, ya que la concentración de heptano sulfonato en los disolventes que componen la fase móvil debe variar en relación a la matriz que se vaya a analizar, para conseguir una adecuada separación. Las matrices de vieira y ostra necesitan una

disminución en la concentración de heptano sulfonato para separar GTX4 de los picos de matriz que eluyen al inicio, con una concentración de 6.5 mM para el disolvente A y 6.25 mM para el disolvente B. La matriz de ostra también presentó problemas de interferencias para la dcGTX3, que se logró resolver con esta disminución del par iónico en la fase móvil. En el caso de las matrices de mejillón y almeja, los picos interferentes no son tan grandes como lo son en el otro grupo, pero aún así se observó la necesidad de hacer cambios en la composición de la fase móvil con respecto a lo descrito en el método PCOX. Por ello la concentración de heptano sulfonato fue de 8.25 mM para ambos disolventes, lo que supone una disminución con respecto al método original.

Se observó que estas interferencias, debidas a componentes fluorescentes naturales de los bivalvos, dependen de: las especies, lugar de muestreo y fecha de recogida. En el caso de las vieiras y las ostras, tanto el tamaño como la cantidad de interferencias debidas a la matriz no sólo dependen del lugar de muestreo sino también de la fecha de recogida así como de las especies; para mejillones y almejas, sólo se observan diferencias cuando el lugar de muestreo varía. Se analizaron varias muestras reales aplicando estas modificaciones para verificar que los cambios propuestos fueran efectivos en muestras de diferentes especies, diferente origen y fecha de muestreo; y los resultados demostraron que las modificaciones funcionan en todos los casos.

Artículo 2. Determination of gonyautoxin-4 in echinoderms and gastropod matrices by conversion to neosaxitoxin using 2-mercaptoethanol and post-column oxidation liquid chromatography with fluorescence detection. Verónica Rey, Marisa Silva, Ana Botana, Vitor Vasconcelos y Luis Botana. Publicado el 30 de diciembre de 2016 en *Toxins* 8(1):1-11; doi:10.3390/toxins8010011.

Este trabajo explora la aplicabilidad del método de cromatografía líquida con detección por fluorescencia y oxidación post-columna (PCOX), para el análisis de diferentes matrices consideradas como vectores no tradicionales de las PSP: gasterópodos, equinodermos, crustáceos y peces. El método PCOX, utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio, ha demostrado ser un método fiable para el seguimiento de toxinas paralizantes en especies de mejillón, vieira, ostra y almeja. Sin embargo, como se había observado en estudios previos

con matrices de vieira y ostra, debido a su alta sensibilidad, puede haber compuestos naturales fluorescentes que coeluyen con GTX4 lo que daría como resultado identificaciones erróneas. Esto ocurrió tanto en el caso de las muestras de equinodermos como en las muestras de gasterópodos que se analizaron. Para superar este reto se aprovechó la capacidad que el compuesto 2-mercaptoetanol tiene para transformar las toxinas GTX (1-4) en su forma reducida STX o NEO: en este trabajo se optimizó la reacción de transformación de GTX1 y GTX4 a NEO mediante el empleo de 2-mercaptoetanol. Se presenta un método nuevo, con una buena recuperación (82.2%, RSD=1.1%, n=3) y que ahorrará tiempo ya que solamente requiere una etapa de reacción. Las muestras que eran sospechosas de contener GTX4 y/o interferencias fluorescentes naturales fueron sometidas a esta reacción de reducción, sirviendo para confirmar la presencia de GTX4 y permitiendo su cuantificación.

Artículo 3. Quantification of PSP toxins in toxic shellfish matrices using post-column oxidation liquid chromatography and pre-column oxidation liquid chromatography methods suggests post-column oxidation liquid chromatography as a good monitoring method of choice. Verónica Rey, Luis M. Botana y Ana M. Botana. Publicado el 13 de febrero de 2017 en *Toxicon* 129:28-35; doi. 10.1016/j.toxicon.2017.02.003.

En este trabajo se analizaron diferentes muestras de molusco mediante cromatografía líquida con oxidación pre- y post-columna con detección por fluorescencia (PreCOX y PCOX respectivamente), para comparar los perfiles de toxinas obtenidos con cada uno de los métodos oficiales de la AOAC y estudiar el grado de acuerdo entre ambos en las matrices estudiadas. Entre las especies de molusco incluídas en este estudio se encuentran algunas para las cuales los métodos no habían sido validados inicialmente: almeja *Donax sp*, vieira *Aropecten sp.* y almeja navaja *Ensis sp.* Fueron analizadas un total de 24 muestras. Los resultados obtenidos por PreCOX y PCOX, el coeficiente lineal de correlación ($r^2=0.94$) y el test t por parejas (dos colas, $\alpha= 0.05$), indicaron que no existen diferencias significativas entre ambos conjuntos de datos. Sin embargo, se encontraron diferencias importantes relacionadas con los perfiles de toxinas: en 16 de las 24 muestras las diferencias entre ambos métodos fueron mayores del 20%; fue notable la diferencia en los resultados para las gonyautoxinas 1

y 4 y decarbomoylgonyautoxinas 2 y 3, debido a una sobreestimación del método pre-columna. Se observó que el método PCOX es una buena herramienta para la identificación de las toxinas del grupo C (C1-4) ya que no se encontraron interferencias de matriz y es capaz de separar cada uno de los isómeros en un tiempo de 24 minutos.

Fue necesario modificar las condiciones de elución en el método post-columna para evitar la interferencia de los picos de matriz a tiempos de retención cercanos a los tiempos de retención de los estándares, principalmente cuando se trabajó con matrices de vieira. Para las demás matrices estudiadas la identificación se llevó a cabo sin problemas de interferencias y la interpretación de los resultados resultó ser sencilla. Una vez optimizado el método PCOX para el análisis de las matrices de interés, resultó ser un buen método para su uso rutinario en programas de monitoreo de dichas matrices.

3.2. BLOQUE II: INNOVACIÓN EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS PSP

Artículo 4. Liquid chromatography with a fluorimetric detection method for analysis of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin based on a porous graphitic carbon column. Verónica Rey, Ana M. Botana, Mercedes Álvarez, Álvaro Antelo y Luis M. Botana. Publicado el 28 de junio de 2016 en *Toxins* 8(7):196-212; doi:10.3390/toxins8070196.

Este artículo presenta el desarrollo y la validación del método de cromatografía líquida con derivatización post-columna y detección por fluorescencia aplicable a las PSP en muestras de molusco, basado en la utilización de una nueva fase estacionaria de carbono grafitizado poroso. Las toxinas PSP tradicionalmente han sido analizadas por cromatografía líquida con derivatización tanto pre- como post-columna y siempre con fase estacionaria a base de sílice. Esta técnica dio lugar a diferentes métodos que necesitan más de una ejecución para analizar las toxinas. En este trabajo se consigue la separación de 13 PSP en un único análisis siendo necesario para ello un tiempo de 37 minutos, lo que reduce considerablemente

el tiempo de análisis con respecto al método PCOX e incluye la capacidad de separar dcNEO, algo que el método citado sólo consigue si se lleva a cabo una ejecución de 75 minutos. También se optimizó el proceso de limpieza de las muestras, incluyendo una extracción en fase sólida con cartuchos SPE Hypersep Hypercarb®. Este nuevo proceso dio muy buenos resultados, puesto que en las matrices estudiadas consiguió eliminar cualquier interferencia natural fluorescente y los resultados de recuperación de las toxinas fueron satisfactorios. El método se ensayó en cuatro matrices de moluscos: mejillón (*Mytillus galloprovincialis*), almeja (*Pecten maximus*), vieira (*Ruditapes decussatus*) y ostra (*Ostrae edulis*). Se proporcionaron los resultados para todos los parámetros estudiados y se mejoraron los límites de detección para la mayoría de toxinas con respecto a los métodos de cromatografía líquida previos: los valores más bajos fueron los de dcGTX2 y GTX2 en mejillón ($0.0001 \text{ mg STX} \cdot \text{diHCl kg}^{-1}$ para cada toxina), dcSTX en almeja ($0.0003 \text{ mg STX} \cdot \text{diHCl kg}^{-1}$), C1 y C2 en vieira ($0.0001 \text{ mg STX} \cdot \text{diHCl kg}^{-1}$ para cada toxina) y dcSTX ($0.0003 \text{ mg STX} \cdot \text{diHCl kg}^{-1}$) en ostra; GTX2 mostró el límite de detección más alto en ostra ($0.0366 \text{ mg STX} \cdot \text{diHCl kg}^{-1}$). Además de todo lo anterior, al haber sido recientemente encontrada la tetrodotoxina en bivalvos en lugares del norte de Europa debido al cambio climático, y puesto que sus signos de toxicidad son similares en el bioensayo a los de las PSP, es importante analizarlas conjuntamente y poseer métodos analíticos que sean capaces de distinguir ambos grupos de toxinas. En este artículo se propone también por ello una modificación del método para el análisis simultáneo de las PSP y la TTX, con algunos pequeños cambios en el gradiente de la fase móvil, aunque el límite de detección obtenido para la TTX no permite su uso en la actualidad con fines regulatorios.

Artículo 5. Rapid analysis of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxins by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using a porous graphitic carbon column.

Verónica Rey, Ana M. Botana, Álvaro Antelo, Mercedes Álvarez, Luis M. Botana. Sometido a *Food Chemistry*.

En este estudio se describe un nuevo método LC-MS/MS basado en el uso de una columna de carbono grafizado poroso que posee la capacidad de discriminar entre la mayoría de las PSP, tanto hidrófilas como hidrófobas, TTX y su análogo 4,9 anhTTX, siendo

la primera vez que un método químico permite la determinación conjunta de todas estas toxinas. Los métodos LC-MS/MS ofrecen una serie de ventajas ante los métodos HPLC-FLD, pero necesitan ser mejorados en términos de sensibilidad, recuperación del analito y estabilidad de los tiempos de retención. Fue posible validar el método para las 13 toxinas PSP hidrófilas, TTX y su análogo y separar 6 PSP hidrófobas, conocidas como GCs, en 20 minutos. El método fue validado para cuatro matrices de molusco: mejillón (*Mytillus galloprovincialis*), almeja (*Ruditapes decussatus*), vieira (*Pecten maximum*) y ostra (*Ostrae edulis*).

El proceso de limpieza con cartuchos SPE Hyperseb Hypercarb®, previamente desarrollado para el método HPLC-FLD, fue también probado con el fin de comprobar su funcionamiento cuando las muestras de bivalvos son analizadas mediante LC-MS/MS. Se observó que es posible reducir considerablemente el efecto de la matriz, uno de los principales problemas que aparece cuando se emplea esta técnica. Los parámetros de validación obtenidos en el caso de las PSP y las TTXs mostraron excelentes resultados en términos de repetibilidad, recuperación del analito, límites de detección y cuantificación, mejorando la sensibilidad para las TTXs considerablemente con respecto al método HPLC-FLD previamente desarrollado. La falta de estándares analíticos comerciales de las toxinas GCs hizo que no fuese posible validar el método para este grupo de toxinas, aunque la posibilidad de separarlas en un mismo análisis del grupo de las PSP hidrófilas supone un avance radical dentro de los métodos de análisis de PSP conjuntamente con TTX. En cuanto a las toxinas GCs, hasta la fecha no existen datos sobre su toxicidad pero sí se conoce su amplia distribución por aguas de todo el mundo.

3.1. BLOQUE I: MEJORA EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS PSP.

Artículo 1. Influence of different shellfish matrices on the separation of PSP toxins using a postcolumn oxidation liquid chromatography method.

Verónica Rey, Amparo Alfonso, Luis M. Botana y Ana M. Botana.

Publicado el 15 de abril de 2015 en *Toxins* 7(4):1324-40; doi: 10.3390/toxins7041324.

<http://www.mdpi.com/2072-6651/7/4/1324/pdf>

Artículo 2. Determination of gonyautoxin-4 in echinoderms and gastropod matrices by conversion to neosaxitoxin using 2-mercaptoethanol and post-column oxidation liquid chromatography with fluorescence detection.

Verónica Rey, Marisa Silva, Ana Botana, Vitor Vasconcelos y Luis Botana.

Publicado el 30 de diciembre de 2016 en *Toxins* 8(1):1-11; doi: 10.3390/toxins8010011.

<http://www.mdpi.com/2072-6651/8/1/11/pdf>

Artículo 3. Quantification of PSP toxins in toxic shellfish matrices using post-column oxidation liquid chromatography and pre-column oxidation liquid chromatography methods suggests post-column oxidation liquid chromatography as a good monitoring method of choice.

Verónica Rey, Luis M. Botana y Ana M. Botana. Publicado el 13 de Febrero de 2017 en *Toxicon* 129:28-35; doi:10.1016/j.toxicon.2017.02.003.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.003>

3.2. BLOQUE II: INNOVACIÓN EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS PSP.

Artículo 4. Liquid chromatography with a fluorimetric detection method for analysis of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin based on a porous graphitic carbon column.

Verónica Rey, Ana M. Botana, Mercedes Álvarez, Álvaro Antelo y Luis M. Botana.

Publicado en 2016 en *Toxins* 8(7):196-212; doi:10.3390/toxins8070196.

<http://www.mdpi.com/2072-6651/8/7/196/pdf>

Artículo 5. Rapid analysis of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxins by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using a porous graphitic carbon column.

Verónica Rey, Ana M. Botana, Álvaro Antelo, Mercedes Álvarez, Luis M. Botana.

Sometido a Food Chemistry.

Rapid analysis of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxins by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using a porous graphitic carbon column

Veronica Rey^a, Ana M. Botana^{a,*}, Alvaro Antelo^b, Mercedes Alvarez^b, Luis M. Botana^{c,*}

^aAnalytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain

^bCIFGA S.A., Plaza de Santo Domingo 20-5^a, Lugo 27001, Spain; alvaro@cifga.es; mercedes@cifga.es

^cPharmacology Department, Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain

*Corresponding author: Ana M. Botana. Dpt. of Analytical Chemistry, Science Faculty, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain. Phone: +34-982-824-071, E-mail: anamaria.botana@usc.es.

Luis M. Botana. Dpt. of Pharmacology, Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain. Phone: +34-982-822-233, Fax no.: +34-982-824-001, E-mail: luis.botana@usc.es.

Abstract

Although paralytic shellfish toxins (PSTs) have been traditionally analyzed by liquid chromatography with either pre- or post-column derivatization and they have been successfully validated through inter-laboratory validation studies, mass spectrometry methods have also been described in literature to be used in monitoring programs. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) detection methods need to be improved in terms of method sensitivity, analyte recovery and retention time stability because of undesirable matrix effects. Furthermore tetrodotoxin (TTX) has been found in bivalves of northern Europe, so it is important to analyze TTX compounds along with PSTs because their signs of toxicity are similar in the bioassay. It is the first time that a chemical method allows the determination of PSTs, both hydrophilic and hydrophobic, alongside TTX and its analogue 4,9-anhydro tetrodotoxin (4,9-anhTTX) by LC-MS/MS using a Hypercarb® column. It was possible to validate the method for 13 hydrophilic PSTs, TTXs and to discriminate 6 hydrophobic PSTs, named as GCs, in 20 minutes. The method was developed for four shellfish matrices: mussel (*Mytillus galloprovincialis*), clam (*Ruditapes decussatus*),

scallop (*Pecten maximus*) and oyster (*Ostraea edulis*). The clean-up procedure used in this work allowed us to obtain good results for the validation parameters in case of PSTs and TTXs. No standard is available up to now for the validation of GCs.

It was possible to reduce considerably the matrix effect with the clean-up procedure employed in this work and so the validation parameters were good in terms of repeatability, detection and quantification limits, and analyte recovery.

Keywords

Mussel; Clam; Scallop; Oyster; PSTs; GCs; TTXs; Hypercarb; LC-MS/MS

1. Introduction

Paralytic shellfish poisoning (PSP) is a common seafood toxicity problem with worldwide distribution. Toxic dinoflagellates are ingested and concentrated by filter-feeding mollusks and then paralytic shellfish toxins (PSTs) get into the food web. Although these mollusks are the traditional pathway for the presence of these toxins, mainly in mussels and clams, they are not the only vectors and there are increasing reports about other sources, such as marine gastropods, crustaceans, and certain fish [Deeds, 2008].

The most prevalent paralytic shellfish toxins (PSTs) can be divided into three families based on structural differences in their functional groups: the carbamate family includes saxitoxin (STX), neosaxitoxin (NEO) and the gonyautoxins (GTX1-4); the decarbamoyl family includes decarbamoyl-gonyautoxins (dcGTX1-dcGTX4) and decarbamoyl-saxitoxins (dcSTX, dcNEO); the N-sulfocarbamoyl toxins include GTX5, GTX6 (also called B1 and B2, respectively) and C toxins (C1-4). A novel group of PSTs were identified in strains of *Gymnodinium catenatum* [Negri, 2007] found in Australian, Chinese, Portuguese, Uruguayan and Spanish waters. They are a new family of PSTs containing a hydroxybenzoate side-chain and named as GC toxins(GC1-6).

The official regulatory method for determining PSTs in shellfish in most countries is the mouse bioassay [AOAC, 2005]. This method gives quantitative information about the toxicity of samples. It is calculated from the time of death in replicate mice injected with acidic extracts of shellfish. It has several limitations, particularly related to ethical concerns with the use of live animals, and so there have been great efforts to establish alternative methods. They include receptor binding assay (RBA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and

surface plasmon resonance (SPR). In addition to these assays, there are also analytical methods to separate individual toxin congeners which can then be identified and quantified [Etheridge, 2010]. High performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) methods are the chemical methods successfully validated for PSTs. They were validated through inter-laboratory validation studies [Lawrence, 2005; Van de Riet, 2010]. As the STX analogues do not contain a chromophore, they have to be oxidized before detection. This derivatization is performed with either pre- or post-column oxidation. The pre-column method [Lawrence, 2005], also called the Lawrence method, was accepted as an alternative for PSTs detection in shellfish samples. It is being used for regulatory purposes in the European Union (EU) [Anon, 2006]. The post-column method (PCOX) [Van de Riet, 2010] was accepted by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) in 2011 as an alternative method for PSTs [AOAC, 2011], when it was validated through a inter-laboratory validation study. This study was undertaken for mussels, clams, oysters and scallops. There are advantages and disadvantages with both methods [DeGrasse, 2011; Rourke, 2008], so the right choice should rather be done with regard to the monitoring environment where the method is used.

Mass spectrometry methods have also been described in literature [Dell'Aversano, 2005; Diener, 2007; Jaime, 2001] for the analysis of PSTs in shellfish monitoring programs. Dell'Aversano et al. [Dell'Aversano, 2005] improved liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) detection capabilities, by establishing a method based on hydrophilic interaction liquid chromatography. It was more sensitive than those of previous studies. In 2007, Diener et al. [Diener, 2007] published a new LC-MS/MS method that used a zwitterionic (ZIC) hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column for the separation of the three groups of PSTs in a single chromatographic run. Other authors have reported different HILIC-MS/MS methods for the determination of PSTs, although method sensitivity, analyte recovery, and retention time stability are compromised due to significant matrix effects [Turrell, 2008]. The high number of interfering peaks in the chromatograms when shellfish extracts are analyzed with LC-MS/MS suggests that an extensive sample clean-up is needed in order to remove either salts or such interfering peaks. Some authors have investigated different types of clean-up procedures such as solid phase extraction (SPE) [Turrell, 2008; Sayfritz, 2008]. More recently, Boundy et al. [Boundy, 2015] proposed a new sample clean-up procedure based on the use of graphitized carbon SPE cartridges that

eliminated matrix interferences, followed by HILIC-MS/MS analysis. This allowed a sensitive, selective and rapid analysis of PSTs from a variety of samples and this method has been subjected to single-laboratory validation and is being used for regulatory testing in New Zealand [Turner, 2015].

On the other side, although tetrodotoxin (TTX) does not belong to the family of PSTs it has the same toxicity symptoms as them [Bane, 2014] and the co-occurrence of both TTX and PSTs was reported [Shiu, 2003]. The mouse bioassay was used in several cases to establish their toxicity, but their presence in seafood might be misdiagnosed because they block sodium channels similarly to STX [Wingerd, 2012]. LC-MS and LC-MS/MS have been generally the best choice to analyze TTX and its related compounds [Bane, 2014].

In addition to the ability of porous graphitic carbon in the sample clean-up procedure, it was recently published the analysis of PSTs and TTX using a HPLC-FLD post-column method with a porous graphitized column [Rey, 2016]. This column has very powerful properties related to separation performance and robustness; moreover in this work samples clean-up was also made with graphitized carbon SPE cartridges, showing good ability to remove matrix interferences.

In this study we describe a new LC-MS/MS method based on the use of a LC porous graphitized column coupled to a mass spectrometry equipment. It has the capability to discriminate the majority of PSTs, both hydrophilic and hydrophobic, TTX and its analogue 4,9-anhydro tetrodotoxin (4,9-anhTTX). The previously developed clean-up procedure with SPE porous graphite cartridges was also tested in order to check the ability of it when bivalve samples were analyzed by LC-MS/MS [Rey, 2016].

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

HPLC grade methanol and acetonitrile, analytical reagent grade trifluoroacetic acid (TFA), dichloromethane, tetrahydrofuran, propionic acid, 2-propanol and ammonium acetate were all from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

Trichloroacetic acid (TCA) and triethylamine were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). HPLC grade water was used to prepare reagent solutions.

Certified reference materials provided by Cifga S.A. (www.cifga.es, Lugo, Spain) were: saxitoxin (STX), neosaxitoxin (NEO), decarbamoylsaxitoxin (dcSTX), gonyautoxin 5

(GTX5), gonyautoxins 1 and 4 (GTX1,4), gonyautoxins 2 and 3 (GTX2,3), decarbamoylgonyautoxins 2 and 3 (dcGTX2,3), N-sulfocarbamoyl-gonyautoxins 2 and 3 (C1,2), tetrodotoxin (TTX) and 4,9-anhydrotetrodotoxin (4,9-anhTTX). Decarbamoylneosaxitoxin (dcNEO) was obtained from NRC (Halifax, Nova Scotia, Canada). Decarbamoylgonyautoxins 1 and 4 (dcGTX1,4) were obtained by hydrolysis under basic pH from GTX1,4 certified reference material. N-sulfocarbamoyl-gonyautoxins 1 and 4 (C3,4), gonyautoxin 6 (GTX6) and hydroxybenzoate toxins (GCs) were obtained from strains of *Gymnodinium catenatum* provided by Cifga S. A.

Commercial toxin-free shellfish samples of mussel (*Mytillus galloprovincialis*), clam (*Ruditapes decussatus*), scallop (*Pecten maximus*) and oyster (*Ostrae edulis*) were used.

2.2. Instrumentation

The HPLC equipment consisted of an Alliance 2695 Separation Module (Waters, Barcelona, Spain) provided with: a quaternary pumps system, an autoinjector with refrigerated rack, degasser, column oven and system controller. A post-column system 515 HPLC pump from Waters was used. This system was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer Quattro MicroTM API equipped with an electrospray (ESI) source (Waters, Barcelona, Spain). The separation and identification of toxins was achieved in a Hypercarb[®] column (i.d. 2.1 mm x 100 mm, particle size 3 μ m) from Thermo (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

2.3. Samples extraction and clean-up

Samples were extracted according to the official procedure for PSTs described in the PCOX method [AOAC, 2011]: 5 g of shellfish homogenate were extracted with 5 mL of 0.1M HCl. The mixture was mixed using a vortex mixer; the pH was adjusted between 2 and 4, preferably 3. When necessary the pH was adjusted by adding dropwise either 5 M HCl or 0.1 M NaOH. The sample mixture was placed into a boiling water bath for 5 min and then cooled down to room temperature. The pH was checked back and adjusted to 3, if necessary. The mixture was centrifuged at 3.000 x g for 10 min, and the supernatant was decanted.

The samples clean-up procedure was that described in literature [Rey, 2016]: 500 μ L of the supernatant solution were deproteinated by adding 25 μ L 30% (w/v) TCA, mixed in a vortex mixer and centrifuged at 16.000 x g for 5 min; 40 μ L of 1.0 M NaOH were then added, mixed and centrifuged again at 16.000 x g for 5 min [AOAC, 2011].

After that, a dichloromethane extraction was made: 500 µL of dichloromethane were added to a deproteinated sample, mixed in a vortex and the aqueous and organic phases separated by gravity. The aqueous phase was cleansed using a Hypersep Hypercarb® SPE cartridge (200 mg, 3 mL) of porous graphitic carbon (PGC) (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain): 500 µL of sample extract were loaded onto the conditioned cartridges and washed with 11 mL of 0.1 M ammonium acetate. The cartridges were previously conditioned with 3 mL of dichloromethane/methanol 80/20 (v/v), followed by 3 mL of methanol and 3 mL of 0.1 M ammonium acetate. Toxins were eluted with 500 µL of 0.1 M citrate buffer (pH= 4.0) in 10% acetonitrile (v/v) [Rey, 2016].

2.4. Matrix effect evaluation

The possible interferences caused by the compounds present in the matrices under study were investigated: mussel, clam, scallop and oyster extracts were used to establish interferences in LC-MS/MS. The standards were diluted in the four types of extracts and chromatographic separation was carried out. The chromatographic conditions were those optimized and described in this study (see "Methods" section).

Matrix effects were calculated according to the following equation, for each toxin and in each matrix:

$$\% \text{ ME} = [(A + B) - B]/A * 100$$

being % ME = percentage of matrix effect, A = area of the toxin standard, B = area of shellfish extract and A + B = area of shellfish extract spiked with the toxin standard.

A value of ME= 1 means that there is no matrix effect; if ME is higher than 1 it means that the ionization has been enhanced, therefore it shows the presence of a positive matrix effect; if ME is less than 1 it means that there has been ionic suppression and so the presence of a negative matrix effect [Rossignoli, 2015].

To calculate the matrix effect, different assays were performed to accomplish the clean-up procedure: 1) shellfish extracts were deproteinated by adding TCA and filtered through a 0.2 µm syringe filter as described in PCOX method [AOAC, 2011]; 2) shellfish extracts were deproteinated by adding TCA and the extract was purified using a Hypersep Hypercarb® (PGC) SPE cartridge as previously described (see "Samples extraction and clean-up" section); 3) extracts were deproteinated by adding TCA, then extracted with dichloromethane and

purified using a Hypersep Hypercarb® (PGC) SPE cartridge as previously described (see "Samples extraction and clean-up" section). Table 1 shows the percent data of the matrix effect for each clean-up procedure.

2.5. Methods

An Alliance 2695 Separation Module coupled to a Quattro Micro mass spectrometer equipped with an ESI source was used for sample analysis. The HPLC system was equipped with a Hypercarb® column (i.d. 2.1 mm x 100 mm, particle size 3 µm) inside a column oven at 25 °C; the injection volume was 10 µL (partial loop with needle overfill mode). Mobile phase composition was: 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water for solvent A, solvent B was acetonitrile and solvent C was water. The flow rate was set at 0.250 mL min⁻¹. The gradient conditions for PSTs and TTX are summarized in Table 1S.

A post-column solution composed by propionic acid/2-propanol 75/25 (v/v) was mixed with the LC eluent through a tee-union, before reaching the electrospray capillary; the flow rate of the post-column solution was 0.075 mL min⁻¹. The Quattro Micro mass spectrometer operated with the following optimized source-dependent parameters (ESI source): capillary voltage 2.7 kV, desolvation temperature 500 °C, desolvation gas flow 850 L/h N₂, cone gas flow 30 L/h N₂, source temperature 150 °C, collision Argon pressure 3x10⁻³ mbar. The cone voltages and collision energies were optimised for each toxin by standard infusion. MassLynx 4.1 with QuanLynx software (Waters, Manchester, UK) was used for data processing. Figure 1 shows the ion chromatogram obtained for the separation of PSTs, both hydrophilic and hydrophobic, together with TTX and 4,9-anhTTX.

The mass spectrometer operated in MRM (multiple reaction monitoring), detecting in positive mode, and analyzed two product ions per PST and TTX (Table 2): one for quantification (the most abundant) and another for confirmation. Collision energies, cone voltages and dwell times were optimised for maximum sensitivity.

2.6. Validation parameters

2.6.1 Linearity

Linearity was calculated by injecting each PST and TTX standard at different concentrations in solvent, calculating the peak areas of the toxins. Equations and the correlation coefficient

(r) for each toxin were obtained by mathematical treatment of analysis data for each compound at different concentrations as shown in Table 2S [Martin-Smith, 1990].

2.6.2 LODs and LOQs

Limits of detection (LODs) for matrix-free toxins were determined from the data for samples extrapolated to a signal to noise ratio of 3. Five blank replicate extracts for each matrix (mussel, clam, scallop and oyster) were analyzed and repeated over 6 days (n=30). The results are expressed as $\mu\text{g STX diHCl eq kg}^{-1}$ where the toxicity equivalent factors (TEF) were taken from Oshima [Oshima, 1995 #20], in case of PSTs; for TTX and its analogue the results were expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$. Limits of quantification (LOQs) were determined multiplying LODs by a factor of 3 [Alder, 2000]. Table 3 shows LODs and LOQs for PSTs and TTXs in the four matrices under study.

2.6.3 Repeatability

Repeatability was calculated for each matrix at 3 different concentration levels: 200 $\mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$, 800 $\mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$ and 1.600 $\mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$, in case of PSTs; 3.225 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0.806 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.202 $\mu\text{g g}^{-1}$, for TTX; 0.375 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0.094 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.023 $\mu\text{g g}^{-1}$, for 4,9-anhTTX. Six replicates were analyzed and repeated over 8 days (n= 48), for each matrix at each concentration level. Relative standard deviation percentages (%RSD) were calculated (Table 4).

2.6.4 Recovery

It was verified by measuring the recovery at a known concentration level of spiked blank samples; six replicates were made for each of the four matrices under study. At the concentration level of spiked blank samples, six replicates were made for each of the four matrices under study. The concentrations and recovery results are summarized in Table 5.

3. Results and discussion

3.1 Optimized chromatography and MS/MS method

The percentage of TFA has a significant influence on the retention time of PSTs, TTX and its analogue, reducing polar retention because it can act as a competitive modifier. Therefore, the first step was to select the right concentration of TFA in the mobile phase: different

percentages of TFA for solvent A were tested (0.025%, 0.050%, 0.075% and 0.1%). Either 0.075% or 0.1% gave good results regarding resolution. In case of 0.075% TFA the first eluted toxins came out earlier than in the case of 0.1% TFA and the peaks shape was worse than with the other concentration: dcNEO and dcSTX eluted 1 minute earlier and TTX and 4,9-anhTTX eluted 0.5 minutes earlier than with the use of 0.1% TFA. Beyond 0.1% there was a delay in the retention time for all toxins, especially for those eluting earlier. In all cases the last eluted toxins did not suffer significant variations in their retention times. Therefore, 0.1% was the concentration of choice for TFA in solvent A.

Acetonitrile and methanol were also tested as organic modifiers for solvent B. Although both organic modifiers have similar strengths [Scientific, 2007] the column pressure difficulties associated with the use of methanol made it necessary to decrease the flow rate to 0.2 mL min⁻¹. No delay occurred in retention times for dcNEO, dcSTX and TTX when methanol was used but significant variations were observed for all other toxins and the peak shape was worse than with the use of acetonitrile; in case of C1 did not elute at all. Consequently, acetonitrile was used as organic modifier.

The MS signal suppression due to the use of TFA was also studied. This loss in ion signal is attributed to the formation of a strong TFA ion-pairing with the analytes [Chan, 2012], reducing the ionization efficiency of the ESI technique [Kuhlmann, 1995]. Several authors developed methods to increase the signal [Chan, 2012; Kuhlmann, 1995]. They used a post-column addition of propionic acid/2-propanol (75%:25%) to the column flow in a ratio 1:2 (propionic acid/2-propanol:TFA) [Kuhlmann, 1995], or a solution of 1% NH₄OH in methanol (v/v) to the column flow in ratios ranging from 0.5:1 to 50:1 (NH₄OH:TFA) [Chan, 2012]. In this work both types of solutions were tested.

A 75:25 (v/v) post-column solution of propionic acid/2-propanol was used and four flow rates were assayed: 0.05, 0.075, 0.1 and 0.125 mL min⁻¹. The column flow rate was 0.250 mL min⁻¹. A standard mixture was injected and dcNEO and dcGTX3 showed the highest signals when the post-column flow rate was 0.05 mL min⁻¹, but for the rest of toxins the intensity signals were the lowest. dcSTX, NEO, STX, GTX5 and C1 had better results than previously when the flow rate was 0.075 mL min⁻¹. A value of 0.1 mL min⁻¹ was only good for GTX3, C2, TTX and 4,9-anhTTX and 0.125 mL min⁻¹ was suitable for dcGTX2, GTX2, GTX4 and GTX1. Therefore, a post-column flow rate of 0.075 mL min⁻¹ was adopted as the optimal one

because 5 of the toxins gave the highest intensity signals; no toxin reached the lowest intensity with this flow rate.

Post-column solutions of 1% and 5% NH_4OH in methanol (v/v) were also tested as described in previous studies [Chan, 2012]. Several post-column flow rates were assayed for each solution: 0.01, 0.05 and 0.1 mL min^{-1} . All results showed less intensity signals than in the case of propionic acid:2-propanol; therefore 75:25 (v/v) propionic acid:2-propanol, at a flow rate of 0.075 mL min^{-1} , was the solution of choice.

Column temperature did not only influence the retention times of toxins but also the peaks signal; therefore, the optimal column temperature was tested for all toxins in a range from 25°C (minimal oven temperature) and up to 50°C. Beyond 50°C the peaks underwent splitting and broadening. 25°C and 30°C showed similar results regarding peak height, but 25°C provided best resolution between adjacent peaks. Then, 25°C was chosen as the optimal column temperature.

3.2 Shellfish matrix interferences and investigative sample clean-up The evaluation of matrix effects on the quantitative analysis of toxins in shellfish is an important and sometimes overlooked aspect of assay validation [Rogatsky, 2005]. In this work, the chromatographic interferences from the matrices under study were investigated. The samples were cleaned-up according to three different procedures (see "matrix effect evaluation" section) and the specificity of the method was evaluated.

The chromatographic interferences from the matrices were investigated by comparison of chromatograms of both blank and spiked matrices: 1) the analysis of mussel, clam, scallop and oyster spiked samples after PCOX clean-up procedure showed important matrix effects for most toxins (except for dcNEO and GTX3) and it also showed high variability in matrix effects for most toxins regarding the species; 2) solid phase extraction sample clean-up with Hypercarb cartridges was effective in reducing matrix effects. Results showed that the matrix effect was higher than 15% for some toxins in some of the matrices; although the variability in matrix effect regarding species decreased, it was still high; 3) clean-up procedure with deproteinization, dichloromethane extraction and solid phase extraction with Hypercarb cartridges was made and the matrix effects were lower than 15% for all PSTs and showed little variations between matrices under study. All these results are summarized in Table 1. Although the difference in the clean-up procedures 2) and 3) was only the extraction with

dichloromethane, it was tested to find out whether this difference was remarkable or not, taking into account our previous results [Rey, 2016] for the separation of PSTs and TTX by HPLC. It was proved that the best procedure was that using dichloromethane (procedure 3): it could remove the lipophilic compounds which made the matrix clearer for investigation of toxins present in the sample.

3.3 Validation parameters

The choice of an appropriate calibration model was necessary for reliable quantification. Therefore, the relationship between the concentration of analyte in the sample and the corresponding response had to be investigated. Table 2S shows linearity results for each individual PST and TTX. The linear regression for each toxin was calculated using at least 10 points and all the correlation coefficients were higher than 0.99. All toxins had a wide range of linearity, except C1 (beyond $0.3133 \mu\text{g g}^{-1}$ did not show linear behavior).

Limits of detection (LODs) were determined from the noise signal for each toxin, multiplying it by 3 and converting it into $\mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$, through calculations. TEFs values were those taken from Oshima [Oshima, 1995]. Limits of quantification (LOQs) were calculated from LODs, multiplying by 3 and converting into $\mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$ [Alder, 2000]. In case of TTX and 4,9-anhTTX both LOD and LOQ values were expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Both limits were calculated from the most intense characteristic transition for each toxin. LOD values ranged from $0.387\text{-}55.813 \mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$ and LOQs values ranged from $1.316\text{-}160.029 \mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$ (Table 3).

All LOQs were below 1/10 of the regulatory limit of $800 \mu\text{g STX}\cdot\text{diHCl kg}^{-1}$, except for NEO which was 1/6. These data suggested that the method has the potential to be used for routine monitoring analysis of shellfish toxicity.

LOD and LOQ values for TTX in the different matrices ranged from 6.202 to 15.101, and from 12.496 to $34.012 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectively. In case of 4,9-anhTTX LODs ranged for the different matrices from 12.410 to 54.713 and LOQs ranged from 24.913 to $132.016 \mu\text{g kg}^{-1}$. In all cases the lowest result belonged to mussel matrix and the highest value belonged to oyster matrix. Although these results are higher than others obtained with LC-MS/MS, there is actually no result for bivalve matrices in literature but for some other marine species [Bane, 2014].

Repeatability results are summarized in Table 4. The RSD percentages obtained for all toxins are within the acceptable range as indicated by IUPAC [Horwitz, 2000] and they appeared to be relatively consistent. Only 4,9-anhTTX showed values higher than 10%: 11.22% in clam samples and 10.91% in oyster at the lowest concentration values, and 10.17% in mussel at an intermediate concentration value.

Recovery values were obtained from each matrix at one level of concentration. Matrix blanks were spiked with known amounts of toxins; the clean-up procedure, described in the samples extraction and clean-up section, was performed and the aliquots were injected in the system. The recovery percentages obtained are summarized in Table 5. As it is seen, all values are within the acceptable range 70-120% [Alder, 2000].

3.4 Identification of Hydroxybenzoate PSTs

Saxitoxin analogues were isolated and characterized from Australian strains of *G. catenatum*, containing a hydrophobic side chain and were designated as GC toxins [Negri, 2003]. These Australian strains contained 12-63% of GC toxins, while in strains from other countries, they also represented an important contribution to the toxin profile. This happened in countries such as Portugal, Spain and China [Negri, 2007]. Therefore, in areas where *G. catenatum* is the toxin source it is important to have shellfish monitoring programs that include them in surveillance [Etheridge, 2010]. The use of HPLC methods will miss the presence of these compounds due to their hydrophobicity, because they will be retained by C18 resins [Negri, 2003]; so that they will be removed when the extracts are passed through C18 cartridges during solid-phase extraction (SPE) preparation. Besides they can also present longer retention times than those of the hydrophilic analogues, therefore they will not appear in those HPLC methods setup for the known hydrophilic PSTs [Negri, 2003]. Several researchers used hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) to determine the presence of these emerging PSTs in sample extracts [Costa, 2015; Vale, 2008]. The structural information obtained from the MS/MS ion product spectrum, revealed at least three diagnostic ion fragments for each toxin [Costa, 2015].

In this work the analysis of a strain of *G. catenatum* with the Hypercarb® column in scan mode pointed out the presence of several compounds that could be related to hydroxybenzoate toxins. The gradient program detailed in Table 1S was used to elute these toxins. Although the initial gradient conditions for PSTs and TTXs were others, to accomplish an optimal

separation of these toxins alongside hydrophilic PSTs and TTXs, slight changes were performed: hydrophilic PSTs and TTXs could be eluted in a run time of approximately 15 minutes and the actual time with these toxins being eluted was 20 minutes (Figure 1). This was not a remarkable change in elution time and nevertheless it is a valuable contribution for the separation and identification of GCs alongside the rest of PSTs and TTXs.

The lack of commercial standards for this group of toxins did not make possible to accomplish a validation study for GCs. The reduced knowledge of their toxicity makes necessary to further investigate the fate of these compounds, so this study will possibly be done in the future.

HPLC-FLD methods are the most widely-used to detect PSTs. These methods has been widely accepted and are for PSTs also the official methodology for routine monitoring. But in recent years, there is a certain increase in the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the analysis of PSTs. High detection limits, salts in shellfish extracts, matrix peaks and the mobile phase used in HPLC-FLD are not compatible with mass spectrometry detection, were the main problems [Gerssen, 2014]. These disadvantages have been solved so LC-MS/MS methods can be a good alternative to HPLC-FLD. In this work, in particular, the mobile phase used in LC-MS/MS method is just like that in HPLC-FLD method [Rey, 2016] although it is true that the use of a post-column solution is necessary. LOD and LOQ for TTX were lower than in previous work [Rey, 2016], it is due to LC-MS/MS allows optimized operating parameters for each molecule. HPLC-FLD needs to separate individual signals for each toxins, instead LC-MS/MS there is no need to make a separation so precise.

Compared with HPLC-FLD methods, the LC-MS/MS methods offer important advantages for GC toxins detection because HPLC methods can miss GC presence since in order to remove interfering compound present in shellfish , SPE cleaning by C18 cartridges is often used, and GC toxins can be retained by SPE C18 resins due to their hydrophobicity. Hydrophobic analogues can also present longer retention times and may not appear in common HPLC-FLD methods [Negri, 2003]. LC-MS/MS is a good tool to GC toxins detection with the rest PSTs.

4. Conclusions

A LC-MS/MS method with Hypercarb® column was optimized for the first time to detect and quantify hydrophilic PSTs, TTX, and 4,9-anhTTX allowing a complete discrimination of all relevant PSTs and TTXs in one run. This method should be of remarkable interest in the

analysis of PSTs and TTXs with regulatory purposes. It also included the identification of some PSTs which contained a hydrophobic side chain named as GC toxins. The time to separate all the toxins was 20 minutes.

A sample clean-up procedure using Hypercarb® cartridges showed excellent results for the selective retention and elution of PSTs and TTXs from complex bivalve samples; therefore it was very useful to minimize matrix effects.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01, AGL2014-58210-R, Xunta de Galicia Axencia Galega de Innovación, ITC-20133020 SINTOX, and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD. From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA—Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement 312184 PHARMASEA.

References

- Alder, L., Holland, P. T., Lantos, J., Lee, M., McNeil, J. D., O'Rangers, J., Van Zoonen, P., & Ambrus, A. (2000). Guidelines for Single Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace Level Concentrations of Organic Chemical. In A. A. Fajgelj (Ed.), *Principles and Practices of Method Validation*, (pp. 18). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Anon. (2006). Commission Regulation (EC) No 1664/2006 of 6th Nov. 2006 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures. In O. J. E. Union (Ed.), vol. L320 (pp. 32).
- AOAC. (2005). Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison. Biological Method. First Action 1959. Final Action.
- . In A. International (Ed.), *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 18th ed., (pp. 79-80). Gaithersburg, MD, USA.

- AOAC. (2011). Official method 2011.02. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in mussels, clams, oysters and scallops. Post-column oxidation method (PCOX). First action 2011. . In A. International (Ed.), *Official Methods of Analysis*). Gaithersburg, MD, USA.
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., & Furey, A. (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*, 6(2), 693-755.
- Boundy, M. J., Selwood, A. I., Harwood, D. T., McNabb, P. S., & Turner, A. D. (2015). Development of a sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 1387, 1-12.
- Costa, P. R., Robertson, A., & Quilliam, M. A. (2015). Toxin Profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Portuguese Coast, as Determined by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Marine drugs*, 13(4), 2046-2062.
- Chan, C. C., Bolgar, M. S., Dalpathado, D., & Lloyd, D. K. (2012). Mitigation of signal suppression caused by the use of trifluoroacetic acid in liquid chromatography mobile phases during liquid chromatography/mass spectrometry analysis via post-column addition of ammonium hydroxide. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(12), 1507-1514.
- Deeds, J. R., Landsberg, J. H., Etheridge, S. M., Pitcher, G. C., & Longan, S. W. (2008). Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine Drugs*, 6(2), 308-348.
- DeGrasse, S. L., Van de Riet, J., Hatfield, R., & Turner, A. (2011). Pre- versus post-column oxidation liquid chromatography fluorescence detection of paralytic shellfish toxins. *Toxicon*, 57, 619-624.
- Dell'Aversano, C., Hess, P., & Quilliam, M. A. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J. Chromatogr. A*, 1081(2), 190-211.
- Diener, M., Erler, K., Christian, B., & Luckas, B. (2007). Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Sep. Sci.*, 30(12), 1821-1825.
- Etheridge, S. M. (2010). Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon*, 56(2), 108-122.

- Gerssen, A. (2014). Analysis of Marine Biotoxins by Liquid Chromatography Mass Spectrometric Detection. In L. M. Botana (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection* Third Edition ed., (pp. 409-427). E.E.U.U.: CRC Press.
- Horwitz, W., Albert, R., & Deutsch, M. J. (2000). Guidelines for collaborative study of procedure to validate characteristics of a method of analysis. *AOAC Official Methods of Analysis*, 1-11.
- Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., & Luckas, B. (2001). Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, 929(1), 43-49.
- Kuhlmann, F. E., Apffel, A., Fischer, S. M., Goldberg, G., & Goodley, P. C. (1995). Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 6(12), 1221-1225.
- Lawrence, J. F., Niedzwiadek, B., & Menard, C. (2005). Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study. *J. Chromatogr. A*, 88, 1714-1732.
- Martin-Smith, M., & Rudd, D. R. (1990). The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality-control of pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*, 40(1-2), 7-19.
- Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M. A., Blackburn, S., Bolch, C., Burton, I., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J., & Willis, R. (2003). Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicol.* , 16(8), 1029-1033.
- Negri, A. P., Bolch, C. J., Geier, S., Green, D. H., Park, T. G., & Blackburn, S. I. (2007). Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*, 6(6), 774-780.
- Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, 78(2), 538-542.

- Rey, V., Botana, A. M., Álvarez, M., Antelo, A., & Botana, L. M. (2016). Liquid Chromatography with a Fluorimetric Detection Method for Analysis of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin Based on a Porous Graphitic Carbon Column. *Toxins*, 8, 1-16.
- Rogatsky, E., & Stein, D. (2005). Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 16(11), 1757-1760.
- Rossignoli, A. E., Mariño, C., Martín, H., & Blanco, J. (2015). Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Combined with Positive and Negative Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of PSP Toxins. *J. Aquac Mar Biol*, 2(2), 21-29.
- Rourke, W. A., Murphy, C. J., Pitcher, G., Van de Riet, J. M., Burns, B. G., Thomas, K. M., & Quilliam, M. A. (2008). Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. *J. AOAC Int.*, 91(3), 589-597.
- Sayfritz, S. J., Aasen, J. A. B., & Aune, T. (2008). Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Toxicon*, 52(2), 330-340.
- Scientific, T. (2007). *Method Development Guide for Hypercarb Columns*.
- Shiu, Y. C., Lu, Y. H., Tsai, Y. H., Chen, S. K., & Hwang, D. F. (2003). Occurrence of tetrodotoxin in the causative gastropod *Polinices didyma* and another gastropod *Natica lineata* collected from western Taiwan. *J Food Drug Anal*, 11(2), 159-163.
- Turner, A. D., McNabb, P. S., Harwood, D. T., Selwood, A. I., & Boundy, M. J. (2015). Single-Laboratory Validation of a Multitoxin Ultra-Performance LC-Hydrophilic Interaction LC-MS/MS Method for Quantitation of Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Shellfish. *JAOAC Int*, 98(3), 609-621.
- Turrell, E., Stobo, L., Lacaze, J. P., Piletsky, S., & Piletska, E. (2008). Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry and development of solid-phase extraction for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. AOAC Int.*, 91(6), 1372-1386.
- Vale, P. (2008). Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1195(1), 85-93.

- Van de Riet, J. M., Gibbs, R. S., Muggah, P. M., Rourke, W. A., MacNeil, J. D., & Quilliam, M. A. (2010). Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: collaborative study. *J. AOAC Int.*, *94*(4), 1154-1176.
- Wingerd, J. S., Vetter, I., & Lewis, R. J. (2012). Voltage-Gated Sodium Channels as Therapeutic Targets. In L. M. Botana & M. Loza (Eds.), *Therapeutic Targets: Modulation, Inhibition, and Activation*, (pp. 63-122). Hoboken, NJ, USA: Wiley & Sons.

Figure caption

Figure 1. Representative ion chromatogram for PSTs and TTXs analysis. Concentrations used for the standards (as $\mu\text{g g}^{-1}$): 0.634 for dcNEO, 1.613 for TTX, 1.219 for dcSTX, 0.188 for 4,9anhTTX, 0.500 for dcGTX3, 1.281 for NEO, 1.223 for STX, 1.375 for GTX5, 2.194 for dcGTX2, 0.513 for GTX3, 0.444 for GTX4, 1.669 for GTX1, 1.388 for GTX2, 0.719 for C2 and 2.506 for C1.

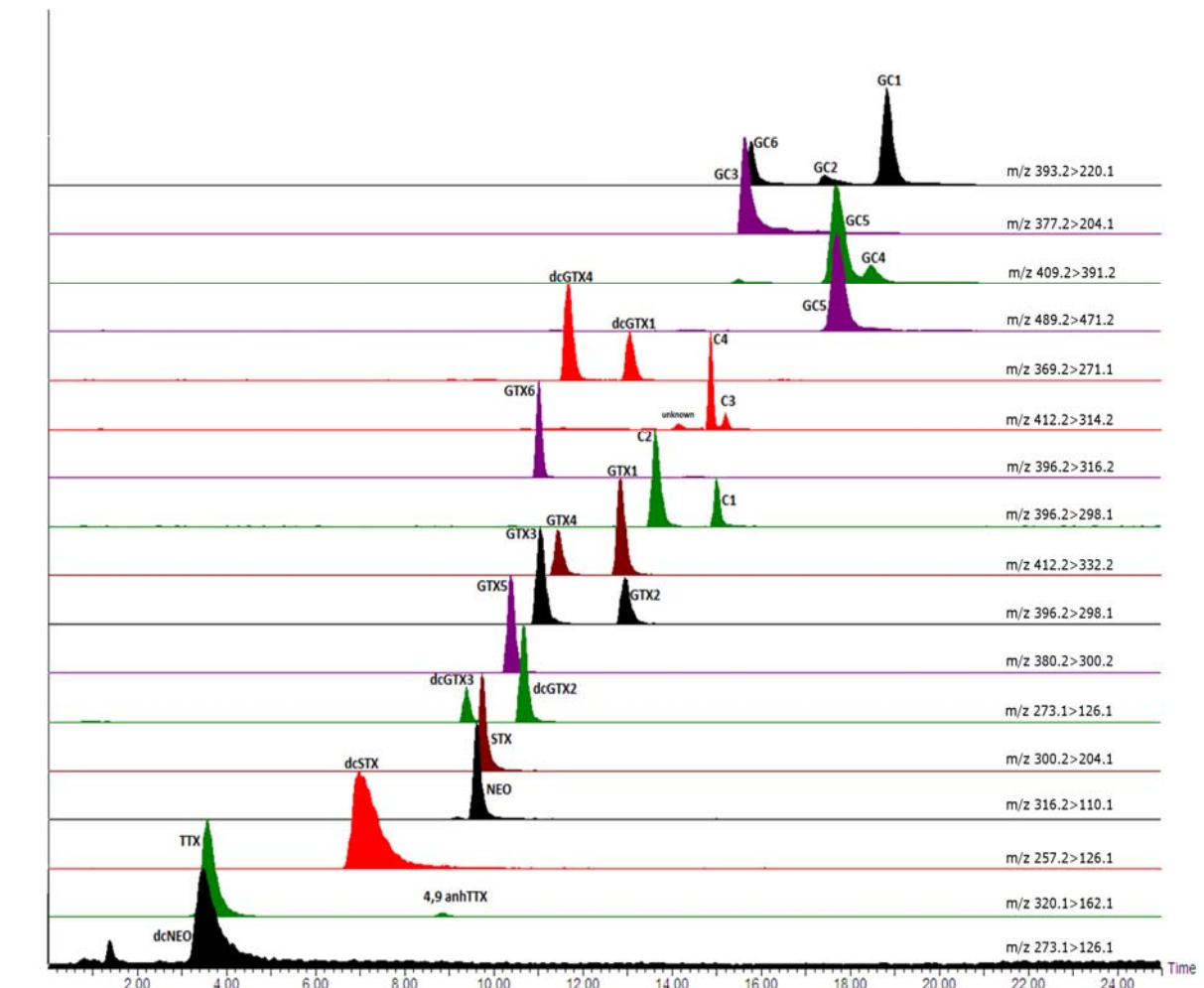


Table 1. Percentage of matrix effect obtained for each toxin standard dissolved in matrix extract after different clean-up procedures.

	dcNEO	dcSTX	NEO	STX	GTX5	dcGTX3	dcGTX2	GTX3	GTX2	GTX4	GTX1	C2	C1	ITX	4,9-anHTX
1	Mussel	4.04	37.81	35.42	33.33	-4.68	-50.53	-59.61	-77.99	-32.67	-86.54	29.97	-30.10	-47.17	28.58
	Ciam	2.27	13.77	-4.57	15.71	-26.81	-36.42	-3.20	-62.59	-24.55	-83.65	29.23	-44.59	-60.21	8.45
	Scallop	0.99	22.56	17.28	9.61	-21.14	5.95	-15.02	-64.04	-16.38	-35.37	-4.86	27.44	-44.86	-61.29
2	Oyster	6.03	-7.57	4.67	3.31	-40.12	-37.06	-2.25	-83.59	-23.31	-83.14	-61.50	-5.59	-42.70	-41.60
	Mussel	-9.68	-3.99	-2.69	-11.48	2.02	-12.82	0.20	-9.97	-31.16	-8.49	1.48	-29.43	-10.55	0.54
	Ciam	-6.70	-6.91	0.97	5.28	3.11	-8.89	0.59	8.67	-26.21	1.56	38.65	-43.66	-10.12	-2.36
3	Scallop	-10.52	-28.72	4.96	-5.98	-11.12	-7.82	-20.09	-15.27	-9.17	3.62	-4.81	17.01	-17.29	2.63
	Oyster	-9.97	-23.82	-9.78	-10.82	-26.97	-26.94	-26.67	-59.23	-16.62	-29.12	-26.42	5.79	-18.78	4.14
	Mussel	2.92	-10.84	6.05	2.27	1.86	-1.51	2.58	0.23	-4.14	12.54	-0.62	-6.49	1.71	7.65
3	Ciam	5.85	-4.75	1.38	2.91	-1.72	2.23	2.72	3.91	-6.15	4.98	5.22	8.38	-0.29	-0.94
	Scallop	-0.94	8.51	8.91	-2.07	3.02	1.80	9.02	7.71	8.39	7.33	2.78	7.40	2.05	3.51
	Oyster	10.94	-6.08	6.28	6.71	1.66	-5.50	3.80	-1.02	-2.17	8.14	8.26	7.36	-10.63	0.90

1) PCOX clean-up; 2) PCOX clean-up and hypercarb cartridge and 3) PCOX clean-up, dichloromethane extraction and hypercarb cartridge.

Table 2. MS/MS parameters for the analysis of paralytic shellfish poisoning toxins, tetrodotoxin and its analogue.

Analogue	RT, min	ESI+ transition	CE, eV	Cone, Volts
dcNEO	3.6	273.1>126.1, 255.2	20, 20	35, 35
TTX	3.8	320.1>162.1, 302.1	25, 25	40, 40
dcSTX	7.2	257.2>126.1, 138.1	20, 20	35, 35
4,9-anhTTX	8.8	302.1>162.1, 150.1	40, 40	40, 40
dcGTX3	9.3	353.2>255.2, 273.1>255.2	20, 20	20, 35
NEO	9.6	316.2>110.1, 177.1	40, 25	35, 35
STX	9.7	300.2>204.1, 179.1	25, 25	35, 35
GTX5	10.4	380.2>300.2, 300.2>204.1	20, 25	20, 35
dcGTX2	10.6	273.1>126.1, 353.2>255.2	20, 20	35, 20
GTX6	10.9	396.2>316.2, 298.1	20, 20	25, 25
GTX3	11.1	396.2>298.1, 316.2	20, 20	25, 25
dcGTX4	11.4	369.2>271.1, 289.1>271.1	20, 20	20, 35
GTX4	11.5	412.2>314.2, 332.2>314.2	20, 20	15, 35
GTX1	12.8	412.2>332.2, 332.2>314.2	20, 20	15, 35
dcGTX1	12.8	289.1>126.1, 289.1>271.1	20, 20	35, 35

GTX2	12.9	396.2>316.2, 298.1	20, 20	25, 25
C2	13.9	396.2>298.1, 316.2	20, 20	25, 25
C4	14.9	412.2>314.2, 332.2>314.2	20, 20	15, 35
C1	15.1	396.2>316.2, 298.1	20, 20	25, 25
C3	15.2	412.2>332.2, 332.2>314.2	20, 20	15, 35
GC3	15.7	377.2>204.1, 263.1	30, 30	35, 35
GC6	15.9	393.2>220.1, 375.1	30, 30	35, 35
GC2	17.5	473.2>375.2, 220.1	15, 30	15, 15
GC5	17.7	489.2>471.2, 341.2	15, 15	15, 15
GC4	18.4	409.2>391.2	15	35
GC1	18.9	393.2>220.1, 375.1	30, 30	35, 35

RT: Retention time

CE: Collision energy

Table 3. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for each toxin in each matrix, expressed as $\mu\text{g STX}\cdot\text{dihCl}$ kg^{-1} .

	dcNEO	dcSTX	dcGTX3	STX	NEO	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX4	GTX1	GTX2	C2	C1	TTX ^a	4, 9-anhTTX ^a
Mussel	LOD	38.414	43.501	6.505	15.317	44.643	2.103	10.007	8.105	22.834	9.466	1.561	0.387	6.202	12.410
	LOQ	77.632	58.303	19.605	60.451	122.102	6.689	26.031	19.405	35.220	29.801	4.303	1.316	12.496	24.913
Clam	LOD	36.301	42.007	4.497	7.389	55.813	1.535	10.016	11.018	25.396	11.410	1.702	0.414	8.003	13.801
	LOQ	70.713	53.301	12.911	34.297	160.029	4.795	25.902	29.042	43.821	36.201	4.756	1.408	18.304	29.403
Scallop	LOD	33.304	41.402	7.698	11.309	41.503	2.673	8.642	9.391	30.597	9.429	1.628	0.443	10.803	16.710
	LOQ	60.798	51.406	23.501	47.102	112.016	8.596	21.304	23.702	61.108	29.676	4.550	1.516	27.809	39.120
Oyster	LOD	54.701	41.088	4.605	9.003	44.003	1.793	8.493	8.291	21.809	10.791	1.620	0.413	15.101	54.713
	LOQ	132.022	50.101	13.100	39.496	120.006	5.653	20.796	20.022	31.798	34.211	4.510	1.406	34.012	132.016

^a: values expressed as $\mu\text{g kg}^{-1}$

Table 4. %RSD values for the repeatability of the method.

$\mu\text{g STX di}\cdot\text{HCl kg}^{-1}$	dcNEO	dcSTX	NEO	STX	GTX5	dcGTX3	dcGTX2	GTX3	GTX2	GTX4	GTX1	C2	C1	ITX*	4,9-anhITX*
200	mussel 9.24	8.01	9.49	8.51	7.79	9.36	8.49	7.89	9.49	6.64	6.49	8.61	9.51	6.14	9.08
	clam 9.60	9.06	8.80	6.20	8.01	9.01	5.45	6.49	9.81	8.17	7.18	7.36	8.62	6.39	11.22
	scallop 5.64	5.71	9.59	8.96	7.24	8.37	8.34	6.47	8.15	7.42	5.08	8.39	8.03	7.43	6.52
	oyster 9.01	9.91	6.00	9.05	9.31	4.34	4.72	6.72	8.90	5.15	6.55	7.21	3.78	2.92	10.91
800	mussel 7.67	7.05	8.07	9.46	9.86	6.40	7.20	9.27	9.62	8.78	5.46	9.71	9.80	2.74	10.17
	clam 9.90	9.00	6.93	5.94	8.39	7.18	6.00	7.15	9.58	6.76	7.42	6.86	8.49	5.96	6.67
	scallop 6.47	5.07	2.60	5.58	5.02	2.71	5.22	5.26	6.78	3.47	4.97	5.43	5.18	4.65	9.91
	oyster 6.66	4.39	3.81	6.44	7.26	4.94	3.60	4.94	8.05	3.19	7.47	7.47	6.16	2.28	5.58
1.600	mussel 7.96	5.21	6.40	7.26	9.29	3.65	7.86	8.66	7.78	9.70	9.18	9.61	8.98	4.82	9.00
	clam 9.95	5.48	7.90	6.73	6.25	7.77	7.63	6.04	7.62	7.74	7.32	5.71	4.01	6.70	5.04
	scallop 5.00	5.34	5.80	4.58	7.36	3.97	3.62	3.94	7.53	4.43	9.29	4.69	4.06	6.32	8.64
	oyster 6.93	3.53	2.83	2.23	5.09	3.27	7.35	3.49	6.24	7.08	6.89	6.28	7.17	3.31	6.24

*: the concentrations used to calculate %RSD for STX were: 3.225 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0.806 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.202 $\mu\text{g g}^{-1}$; for 4,9-anhSTX

they were : 0.375 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0.0934 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.023 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Table 5. Percentage of recovery (3 days, 6 replicates, n=18) for each toxin in mussel, clam, scallop and oyster matrices.

	dcNEO	dcSTX	NEO	STX	GTX5	dcGTX3	dcGTX2	GTX3	GTX2	GTX4	GTX1	C2	C1	ITX	4,9-anhITX
ug g ⁻¹	0.63	0.760	0.799	0.381	0.701	0.030	0.128	0.259	0.685	0.221	0.830	0.718	2.505	1.488	0.117
Mussel Recovery%	79.71	109.31	109.76	88.65	73.04	122.15	78.51	72.24	75.45	79.82	92.50	73.57	119.58	119.31	85.77
SD%	3.54	1.87	2.31	4.14	5.05	5.80	5.83	4.11	4.36	4.41	3.46	3.80	3.44	4.36	4.39
Clam Recovery%	81.20	88.68	86.53	74.19	77.22	117.71	118.93	73.12	83.41	73.32	93.79	73.98	111.22	118.21	82.84
SD%	4.23	3.06	2.87	4.14	3.38	3.59	3.23	3.54	4.66	5.25	2.38	5.51	4.42	4.86	5.47
Scallop Recovery%	78.93	112.11	118.68	87.58	75.84	118.56	115.24	89.29	112.38	117.41	107.66	112.80	109.30	111.24	77.35
SD%	3.52	2.27	5.72	2.07	3.77	4.23	2.32	5.22	4.99	3.47	4.06	4.94	4.88	5.60	5.60
Oyster Recovery%	77.65	111.36	79.02	83.08	89.82	93.24	111.22	81.12	84.61	73.73	89.29	80.56	78.76	90.01	74.14
SD%	4.78	3.59	2.73	4.97	4.51	4.83	2.64	5.21	5.25	5.13	3.15	4.76	5.09	5.12	5.12

Supplementary material

Table 1S. Gradient conditions for separation of PSTs (hydrophilic and hydrophobic toxins) and TTX.

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Solvent C (%)
0	100	0	0
3	100	0	0
4	50	5	45
10	30	10	60
10.5	60	35	5
17.5	30	50	20
20.5	30	50	20
21	100	0	0
30	100	0	0

Table 2S. Toxin linearity results: calibration curves equations and the corresponding correlation coefficients.

	Range in mg kg ⁻¹		Correlation (r)
	Lower	Upper	
dcNEO	0.040	10.149	0.9994
dcSTX	0.038	19.500	0.9956
dcGTX3	0.008	8.000	0.9991
STX	0.019	19.560	0.9993
NEO	0.040	20.500	0.9976
GTX5	0.011	11.000	0.9927
dcGTX2	0.008	35.100	0.9995
GTX3	0.002	8.200	0.9969
GTX4	0.003	7.100	0.9981
GTX1	0.013	26.700	0.9973
GTX2	0.043	22.200	0.9992
C2	0.003	5.750	0.9961
C1	0.008	0.313	0.9991
TTX	0.003	25.800	0.9994
4,9-anhTTX	0.006	3.000	0.9994

4.DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Si bien las FANs son fenómenos que han tenido lugar a lo largo de toda la historia, en los últimos años las consecuencias sobre la salud pública y los impactos económicos de estos eventos parecen haber aumentado en frecuencia, intensidad y distribución geográfica. Estos episodios son los responsables de importantes pérdidas en el sector acuícola, pesquero y marino a nivel mundial [263]. Son las principales razones por las cuales el monitoreo de toxinas marinas se ha convertido en una cuestión muy importante. Las autoridades de todo el mundo se han visto obligadas a instalar sistemas de monitoreo que garanticen la seguridad de los consumidores de moluscos. La situación normativa en Europa con respecto a los límites reglamentarios y los métodos oficiales que deben emplearse para la detección de las toxinas marinas está siendo actualmente sometida a un escrutinio crítico con algunos grupos de toxinas [264]. Este es el caso de los grupos de las PTXs [265] y YTXs [266] que sí se encuentran legisladas a pesar de que se sabe que carecen de efectos tóxicos demostrados en seres humanos. En el extremo opuesto se encuentra el grupo de la TTX, cuya presencia en molusco en las costas europeas ha sido recientemente reportada [157, 158], y aunque es bien conocido su efecto letal, actualmente no existe legislación en Europa aplicable a este grupo de toxinas. Lo mismo ocurre con las PLTXs y las CTXs [264], sus efectos tóxicos en humanos han sido probados y a pesar de su reciente aparición en nuevos vectores de las costas europeas, todavía no se han establecido leyes para su control.

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de los métodos aplicables a la detección de las nuevas toxinas de la familia de la TTX y sobretodo de las PSP.

En el caso de las toxinas del grupo de las PSP el método históricamente empleado para su detección en muestras de molusco ha sido el MBA [26]. La normativa europea establece que el contenido de toxinas PSP en moluscos deberá ser detectado mediante el análisis biológico aunque establece como método alternativo el denominado método de Lawrence que podrá utilizarse para la detección de las toxinas conforme fue publicado por la AOAC [267], siendo ambos los métodos oficiales para la detección de estas toxinas. Mientras el método biológico sólo determina la toxicidad total de la muestra, el método analítico facilita información cualitativa y cuantitativa sobre el perfil de toxinas. El método de Lawrence muestra una serie de inconvenientes bien documentados en la bibliografía [239, 240, 255], es por ello que el método HPLC-FLD con oxidación post-columna de Oshima [229] ha sido utilizado durante

años por muchos laboratorios para la detección de las PSP en sus controles rutinarios, y se sigue empleando aunque no de manera oficial. El método de Oshima muestra como principal ventaja la capacidad de separar los análogos de las toxinas PSP, pero para ello se requiere un tiempo de análisis demasiado largo. En el año 2008 [230], se publicó un nuevo método HPLC-FLD para la determinación de las PSP basado en el método de Oshima que ofrece grandes ventajas con respecto al método original, puesto que se consiguió reducir el tiempo de análisis considerablemente solventando así el principal inconveniente que ofrecía. Este nuevo método ha sido validado [250, 251] para mejillón (*Mytillus edulis*), almeja (*Mya arenaria*), vieira (*Placopectic magellanicus*) y ostra (*Crassostrea virginicus*) y se adoptó como método oficial por la AOAC en el año 2011 [252].

El trabajo llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral se centró inicialmente en la separación y cuantificación de las toxinas PSP en diferentes muestras de moluscos utilizando el método HPLC-FLD con oxidación post-columna (PCOX). El objetivo de utilizar el método de PCOX fue evaluar tanto su funcionamiento con especies pertenecientes a distintos géneros dentro del grupo de moluscos bivalvos como sus posibles ventajas.

Para el análisis cualitativo en cromatografía se emplea el tiempo de retención, que es característico de cada compuesto en cada sistema cromatográfico. Únicamente el empleo del tiempo de retención resulta difícil para asegurar la presencia de un compuesto en muestras complejas, que pueden contener coextractos fluorescentes naturales como en el caso de las muestras de bivalvos marinos, aunque sí se puede asegurar su ausencia. A menudo es deseable analizar las muestras también sin oxidación, para diferenciar de este modo las toxinas PSP de este tipo de compuestos indeseables que puedan eluir junto con las propias toxinas. Para realizar esto, cuando se emplea el método PCOX, es necesario cambiar los reactivos post-columna por agua y volver a analizar las muestras, haciendo que sea un trabajo muy tedioso y alargando considerablemente el tiempo de análisis de las muestras [240].

El uso de disoluciones de calibrado a partir de extracto de matriz libre de toxinas se implementó en el método oficial PCOX, en un esfuerzo por combatir el cambio en los tiempos de retención de las toxinas de elución más temprana, cosa que ocurre con GTX4 y GTX1. El tejido de molusco empleado para diluir los patrones produjo un ligero cambio positivo en la elución de estas toxinas [251], es decir hubo una mayor coincidencia en los tiempos de retención en relación a las muestras reales. En este trabajo, las muestras analizadas por PCOX también originaron problemas con respecto a las toxinas de elución temprana. Al

igual que se informa en un estudio de colaboración previo [251], acerca de los problemas encontrados en algunos laboratorios para separar GTX4 de los picos debidos a la matriz, en nuestro trabajo se observó que éstos coeluían con GTX4, primera toxina en eluir, en las cuatro matrices que se estudiaron. Este problema sólo era conocido en muestras de vieiras [251, 268], en las cuales se suponía que los componentes de los extractos de estos moluscos eluían en esa región y perturbaban el equilibrio cromatográfico de los componentes. Para paliar este efecto se sugirieron, en trabajos previos, cambios en la composición de los disolventes de la fase móvil [268]. Las condiciones descritas en esos trabajos funcionaron en nuestro caso para las muestras de mejillón y almeja pero no para vieira y ostra, donde las interferencias son mayores y variables dependiendo tanto de la zona como de la fecha de muestreo. No todas las toxinas PSP muestran la misma toxicidad: en el caso de la GTX4 su alta toxicidad con respecto a la STX [229] da como resultado un efecto significativo sobre la toxicidad total de la muestra, lo que hace crítico obtener una buena separación de esta toxina con cualquier pico de interferencia.

En el caso de la ostra se vio que también existían interferencias con dcGTX3, por lo tanto fue necesario ajustar la fase móvil en función de la especie que se pretendía analizar. Estos resultados reafirman lo descrito por algunos autores [239], que sugieren la necesidad de validar los métodos analíticos, o por lo menos verificar su rendimiento, para cada una de las especies de interés. En el caso concreto del método oficial PCOX que fue inicialmente validado para vieira (*Placoplectic magellanicus*) y ostra (*Crassostrea virginicus*) previamente a su implementación, se requieren validaciones adicionales en otras especies de vieiras y ostras. Además, la importancia de pruebas completas con los métodos HPLC-FLD en muestras locales con variabilidad temporal y espacial es fundamental debido a la influencia que muestra la matriz, tanto en la separación cromatográfica como en la recuperación de las propias toxinas.

En Europa la gran mayoría de las intoxicaciones humanas atribuidas a mariscos contaminados con biotoxinas marinas se han relacionado con moluscos bivalvos vivos, ya que es así como se comercializan y en algunos casos también se consumen. El número de toxinas marinas a ensayar se ha actualizado a lo largo de los años. Los métodos de ensayo también se actualizaron para incluir métodos analíticos como alternativas o reemplazando al MBA. No obstante, no se ha llevado a cabo una revisión de los grupos de animales que actúan como

vectores de toxinas marinas, manteniéndose sin cambios desde las directivas establecidas en el año 2004 [53, 269].

El aumento del consumo de pescados y mariscos y la búsqueda de nuevos recursos pesqueros o de acuicultura para satisfacer la creciente demanda de estos productos, puede estar exponiendo a las poblaciones de la UE a nuevos vectores de toxinas no controlados regularmente. Existe un aumento en la producción y captura de especies para las cuales los actuales programas de monitoreo no han sido adecuadamente diseñados. Para vectores no bivalvos no se han establecido, hasta la fecha, detalles específicos sobre los planes de muestreo. Este grupo incluye animales que se alimentan por filtración, otros son herbívoros, mientras existen grupos que se alimentan de otros bivalvos entre otras presas [270]; por ello resulta complicado establecer un plan de muestreo para este grupo, pues habría que tener en cuenta las diferentes estrategias de alimentación de estos organismos.

Los métodos europeos de referencia para la determinación de biotoxinas se desarrollaron y optimizaron para moluscos bivalvos. En este sentido, parte de la investigación realizada en el presente trabajo se centró en la aplicación del método PCOX para la identificación de toxinas PSP en matrices consideradas no tradicionales, en este caso equinodermos y gasterópodos. La producción o captura de equinodermos y tunicados en la UE es residual en comparación con pescados y otros mariscos. Sin embargo como respuesta al comercio mundial, en particular al mercado asiático, se ha mostrado un gran interés en la UE en la explotación de estos recursos marinos [270]. La comercialización de gasterópodos y crustáceos marinos ha ido en aumento en los últimos años [271]. Según informes de la FAO [271] la pesca de crustáceos superó la producción de moluscos bivalvos en la UE durante los últimos años, y la pesca de gasterópodos marinos ha aumentado sustancialmente, hasta llegar a duplicarse en las dos últimas décadas. A la vista del creciente interés por parte de los consumidores en estas nuevas especies, toma especial importancia evaluar la exposición de los consumidores a las biotoxinas marinas a través de estos nuevos vectores, y para ello ajustar los métodos de referencia existentes para estas nuevas matrices.

Debido a la alta sensibilidad que presenta el método PCOX a las interferencias fluorescentes naturales de la matriz cuando se trabaja con matrices no tradicionales, se propuso un método rápido, fácil y económico para confirmar la presencia de GTX4 en estas especies, puesto que se observó que coeluye con picos de matriz. PCOX, como se mencionó anteriormente, requiere del uso de extractos de matriz libres de toxinas, pero en el caso de los

organismos de interés no estaban disponibles. Se propuso por ello un nuevo método de transformación de GTX1,4 en NEO que se basa en la capacidad de los reactivos tiol para reducir las toxinas GTXs a STX o NEO, basándose en lo descrito en trabajos previos [272, 273]. Aunque los resultados de conversión no fueron tan altos como se esperaba (90% [273]), sí se logró un alto porcentaje de conversión (82.2%) que permite confirmar la presencia de GTX4 en las muestras y cuantificarla. Además la reacción de transformación se simplificó a un solo paso, lo que supone un importante ahorro de tiempo en el procesamiento de la muestra.

Los métodos analíticos son capaces de separar los isómeros de forma individual, pudiendo así identificarlos y cuantificarlos. Esta ventaja es importante, como ya se ha mencionado, debido a que no todos los análogos de la STX presentan la misma toxicidad, y el perfil de estas toxinas en las muestras es diferente del perfil de toxinas de los dinoflagelados de los que proceden, puesto que los moluscos producen conversiones durante la metabolización de estos analitos. Para el grupo de las PSP la técnica HPLC con detección por fluorescencia es hoy en día la más establecida. Tanto el método HPLC-FLD con oxidación pre-columna como el método con oxidación post-columna, proporcionan mayor sensibilidad cuando se comparan con el MBA y ambos generan un valioso cálculo del perfil tóxico de las muestras, no disponible previamente a través del uso sólo del MBA.

En la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo un estudio comparativo entre el método oficial PreCOX y el método PCOX. Para ello se analizaron diferentes muestras pertenecientes a distintas especies, empleando ambos métodos con el fin de obtener un perfil de toxinas de cada una de las muestras y tener información fiable sobre el grado de concordancia entre los resultados de ambos, para las matrices que se emplearon en dicho estudio. Aunque el método PreCOX cumple con los criterios de seguridad del MBA tiene varios inconvenientes, bien conocidos por la comunidad científica, cuando se aplica en un ámbito rutinario y legal [240, 255]. Es por ello que a pesar de que esta técnica ha sido establecida como herramienta regulatoria, incluso con esta aprobación es improbable que muchos laboratorios la implanten debido a: sus limitaciones de tiempo, costes de instrumentación y la necesidad de disponer de científicos especializados en el análisis de muestras e interpretación de los resultados debido a los múltiples productos de oxidación que se obtienen para cada toxina (Tabla 3 de la introducción). El método PCOX ofrece una serie de ventajas con respecto al método de

oxidación pre-columna (Tabla 4): el proceso de preparación de las muestras para su posterior análisis es mucho más simple y menos laborioso, tiene la capacidad de separar todos los isómeros lo que implica que la toxicidad total de la muestra es más exacta cuando se usa este método, la cromatografía es más simple puesto que no existen múltiples productos de oxidación como en el caso de PreCOX, la respuesta rápida en muestras que contienen toxinas y la sensibilidad del método es mejor que la de los dos métodos oficiales, MBA y PreCOX. En cuanto a los inconvenientes que presenta cabe resaltar: son necesarias dos columnas cromatográficas para el análisis de todas las toxinas, el tiempo de análisis inicial es de 24 minutos frente a los 15 minutos de PreCOX, algo que es importante cuando se analizan muestras que no contienen toxinas (Fig. 18 de la introducción); es muy laborioso analizar las muestras sin oxidar puesto que es necesario cambiar los reactivos post-columna y quizá la desventaja más importante es que no es capaz de identificar y cuantificar GTX6 y dcNEO para las cuales sí existen en estos momentos estándares comerciales disponibles [240].

Tabla 4. Resumen de los requerimientos y dificultades para la implementación de los dos métodos HPLC-FLD para la detección de toxinas PSP en moluscos

	PreCOX	PCOX
Nº columnas LC	1 columna con excelente vida útil	2 columnas con vida útil corta
Preparación de la muestra	Muy laboriosa	Sencilla y rápida
Tiempo de análisis completo	30 min + 45 min = 75 min	24 min x 2 = 48 min
Nº de análogos	16 análogos	14 análogos (excluye dcNEO y GTX6)
Separación de epímeros	No	Sí
Cromatografía	Compleja	Sencilla
Interpretación de los resultados	Difícil y es necesaria mucha práctica	Dificultad intermedia
Correlación con MBA	Buena	Buena

Hasta la fecha se han publicado un buen número de estudios donde se comparan ambos métodos oficiales, MBA y PreCOX [239]; sin embargo, son menos los que contrastan el

nuevo método PCOX con PreCOX [230, 240]. Los datos que se obtuvieron en este trabajo demuestran que existe buena correlación entre los resultados generados por ambos métodos.

Tras el análisis estadístico de los resultados obtenidos tampoco se encontraron diferencias significativas entre los datos, lo que concuerda con los trabajos previamente publicados [230, 240]. Sin embargo, tras el estudio del perfil de toxinas generados por cada uno de los métodos sí se observaron diferencias en las cantidades de algunas toxinas, este es el caso de GTX1,4 y dcGTX2,3, lo que implica que la toxicidad total de la muestra sea diferente dependiendo del método analítico empleado dada la gran contribución de estos análogos. Debido a que estas toxinas no son fácilmente cuantificables por PreCOX, algo ya resaltado por algunos investigadores [274], los resultados se consideraron poco fiables dada la sobreestimación existente al no separar pares de epímeros; PCOX reportó resultados de toxicidad más precisos en términos de perfil tóxico y cuantificación de toxicidad.

La técnica de HPLC-FLD presenta un desafío importante debido a que es posible que los compuestos naturales fluorescentes de las muestras puedan interferir con la identificación de las toxinas, como ya se ha informado [275]. Se observó que las muestras de vieira empleadas en este estudio presentaban interferencias de matriz importantes tras el análisis por ambos métodos, esto impedía la identificación de algunos analitos, por lo que se tuvieron que aplicar modificaciones en los procesos tanto de extracción como de elución para solventar estas dificultades. Esto demuestra que es crucial verificar el rendimiento de cada método con las especies de interés.

Aunque PreCOX demuestra ser más robusto y la vida útil de la columna cromatográfica es excelente, las importantes ventajas de PCOX afirman que su uso como método de identificación y cuantificación de las PSP en las muestras estudiadas es una buena opción. Sin embargo, se recomienda que la elección entre ambos métodos HPLC-FLD debe ser hecha en el contexto del objetivo del trabajo, disponibilidad de la instrumentación necesaria y tanto disponibilidad como habilidad del analista, puesto que en ambos casos es necesario un adecuado entrenamiento.

A pesar de que estos métodos basados en HPLC-FLD se están utilizando hoy en día en diferentes laboratorios a lo largo de todo el mundo para pruebas oficiales de control, existe todavía margen para un mayor desarrollo y mejora de la eficiencia en ambos casos. En el caso concreto de PCOX, aunque tiene importantes ventajas, existen una serie de mejoras que la

comunidad científica está demandando [239]. En los trabajos de validación del método [250, 251], los autores afirman que pueden llegar a realizarse 600 inyecciones antes de que se llegue a detectar un deterioro significativo en el funcionamiento de la columna cromatográfica. Sin embargo, se ha observado en el trabajo desarrollado en esta Tesis que tanto la edad como el estado de la columna tienen gran impacto en la resolución y ello se debe a que las condiciones de trabajo que se emplean en el método no son las ideales para el tipo de columnas que se utilizan, lo que provoca un acortamiento en la vida útil de las mismas.

Además se vio que el hecho de que se almacene una columna y luego se recupere para analizar muestras o estándares, hace que en algunos casos la columna ya no funcione en absoluto, incluso si la cantidad de inyecciones no es muy alta en el momento en el que fue almacenada. Esto pone de manifiesto la necesidad de proponer nuevas columnas que proporcionen una mayor vida útil y que además mejoren la eficacia de la separación, puesto que algunas toxinas no se resuelven completamente: este es el caso de GTX5 que sólo se resuelve un 50% de la línea base y dcSTX y STX que presentan una resolución del 70% de una en relación a la otra [230].

Por otra parte, debido a los importantes avances en el campo de desarrollo de estándares analíticos para las biotoxinas marinas, un requisito claro es la extensión del método PCOX para la identificación y cuantificación de dcNEO. Esta toxina no se incluyó inicialmente en el método debido a su coelución con NEO bajo las condiciones de elución descritas. Es posible sin embargo resolver dcNEO y NEO modificando el gradiente, pero el tiempo requerido para ello sería de 75 minutos [251]. Aunque desde el punto de vista regulatorio, esto no es considerado un problema importante ya que la toxicidad de dcNEO es menor que la de NEO y en el peor de los casos se haría una ligera sobreestimación de la toxicidad total de la muestra, sí sería interesante conseguir incluir este analito dentro del rango de toxinas detectables por PCOX.

Serían especialmente bienvenidos métodos HPLC-FLD más rápidos, puesto que para la identificación de todas las toxinas para las que PCOX se encuentra validado son necesarios dos análisis de 24 minutos aproximadamente, lo que supone un tiempo total de 48 minutos.

En vista de las carencias que presenta PCOX, en la presente Tesis Doctoral se describe un nuevo método HPLC-FLD con oxidación post-columna. Este método está basado en el uso de una nueva columna Hypercarb®, cuya fase estacionaria está compuesta por carbono

grafitizado poroso, y que es capaz de separar 13 análogos del grupo de las PSP en tan sólo 37 minutos. Este nuevo relleno de columna presenta unas propiedades únicas como fase estacionaria, que lo distinguen de los rellenos convencionales de las columna cromatográficas. Proporciona tanto una retención como una separación adecuada para compuestos polares, tiene la capacidad de separar isómeros y otros compuestos estrechamente relacionados y es estable en todo el rango de pH por lo que permite el uso de fases móviles agresivas [276]. Además este tipo de columnas ofrecen la posibilidad de ser regeneradas, lo que hace que se consiga devolver la columna a las condiciones iniciales. Fueron posibles aproximadamente 6.000 inyecciones, lo que supone 10 veces más de lo que permiten las columnas PCOX y no se observaron problemas tras su almacenamiento. Se separaron e identificaron 13 toxinas PSP correctamente en el estudio, incluyendo dcNEO; todas mostraron una resolución del 100% con respecto a la línea base y el tiempo de análisis necesario para ello se acortó a 37 minutos, lo que supone una mejora importante con el método de la AOAC [252]. Para la mayoría de las toxinas los valores de LOD y LOQ obtenidos se mejoraron con respecto a los reportados en los métodos pre- y post-columna publicados anteriormente [253, 267]; además, los resultados obtenidos en este método suponen una mejora importante tanto en el tiempo de análisis como en los parámetros de validación, en relación a los resultados generados en la optimización que se realiza en esta Tesis para el método de PCOX [277] (Tabla 5), con la excepción de GTX5 y C1 para las cuales con el nuevo método se obtuvieron resultados ligeramente superiores. Aun así, este nuevo método propuesto muestra buena capacidad de detección y cuantificación para fines regulatorios.

Tabla 5. LODs y LOQs (mg STX•diHCl/kg) obtenidos para mejillón con ambos métodos en nuestro laboratorio

	PCOX		MÉTODO HPLC-FLD PROPUESTO	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
dcNEO			0.0045	0.0070
dcSTX	0.0047	0.0141	0.0004	0.0007
dcGTX3	0.0071	0.0213	0.0006	0.0019
STX	0.0100	0.0300	0.0044	0.0055
NEO	0.0239	0.0717	0.0093	0.0163
GTX5	0.0011	0.0033	0.0027	0.0099
dcGTX2	0.0210	0.0630	0.0001	0.0003
GTX3	0.0055	0.0165	0.0012	0.0113
GTX4	0.0183	0.0549	0.0015	0.0059
GTX1	0.0642	0.1926	0.0037	0.0117
C2	0.0011	0.0033	0.0003	0.0007
GTX2	0.0099	0.0297	0.0001	0.0038
C1	0.0001	0.0003	0.0002	0.0005

Conocido el impacto que la matriz de los distintos moluscos tiene en la eficacia de la separación cromatográfica y los problemas que genera en la identificación de las toxinas [239], se hicieron diversos intentos para minimizar los efectos de la matriz: se ensayaron diferentes procedimientos de extracción, utilizando filtros de corte por peso molecular y tanto diferentes cartuchos de fase reversa como de intercambio iónico; sin embargo no se consiguió eliminar el efecto de la matriz. Finalmente se desarrolló un proceso de limpieza de las muestras basado en el empleo de cartuchos SPE de PGC que permite eliminar cualquier interferencia cromatográfica y simplifica considerablemente la interpretación de los resultados, evitando así falsos positivos o una cuantificación errónea de las toxinas, aunque para la eliminación completa de la matriz fue necesario realizar una desproteinización de la muestra seguida de la extracción con diclorometano, previos a la limpieza con cartuchos (Figura 21). En esta secuencia de pasos, se consiguió eliminar cualquier tipo de interferencia en las especies de moluscos utilizadas en el estudio.

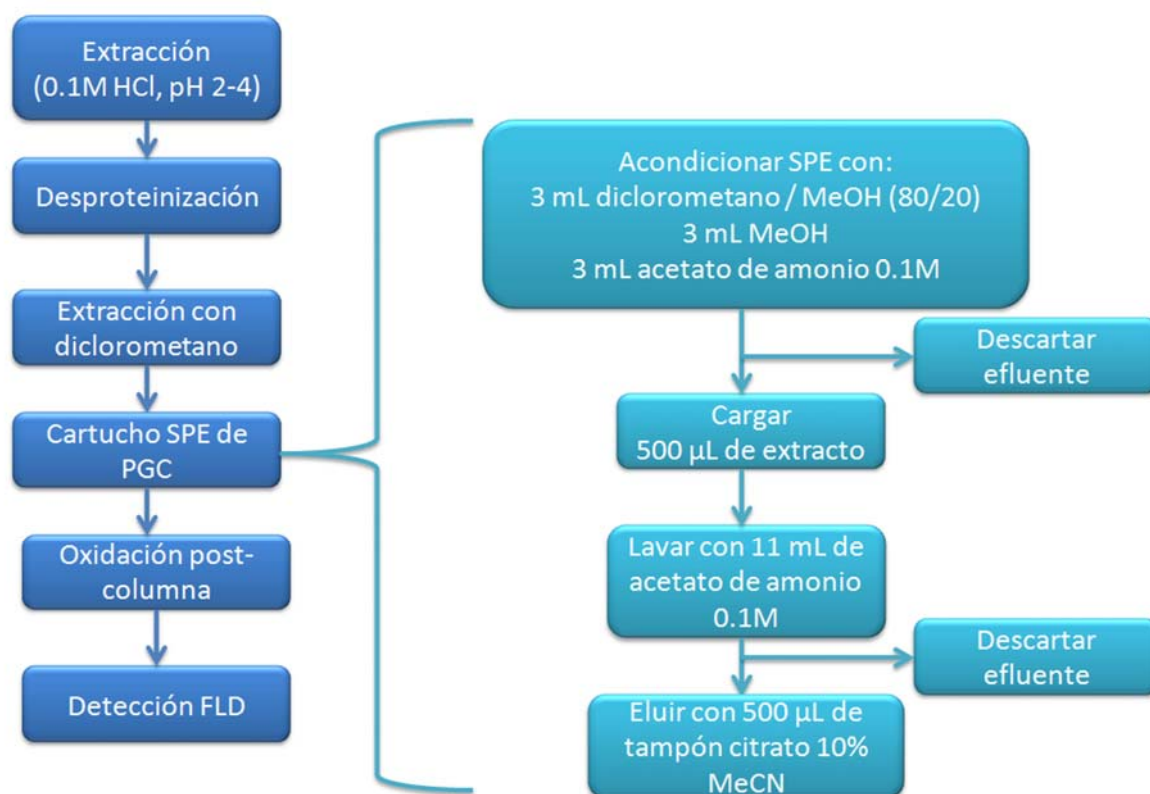


Figura 21. Diagrama del proceso de extracción y limpieza de las muestras de moluscos

Por otra parte y dado que en la última década la TTX ha sido encontrada en diferentes especies en las costas europeas [157, 158, 278], aunque se ha asociado esta toxina históricamente a aguas tropicales, varios investigadores han formulado la teoría de la migración Lessepsiana [155], para explicar la reciente aparición de TTX en regiones europeas. Esta migración se ha producido debido a la apertura del Canal de Suez en el año 1869 que ha beneficiado la invasión del Mar Mediterráneo por parte de especies procedentes del Mar Rojo; además el aumento de la temperatura de las aguas costeras como resultado del cambio climático, ha ayudado a que estas especies marinas típicas de aguas tropicales y subtropicales se adapten a aguas menos cálidas. De hecho, ya se han descrito casos de intoxicaciones debidas a la ingesta de TTX en las costas europeas [156, 279], lo que pone de manifiesto la existencia de nuevos riesgos sobre la seguridad alimentaria. Hoy en día aquellas intoxicaciones que antes se diferenciaban por el área geográfica en la que sucedían, son más difíciles de distinguir. Esto sumado a que la TTX y las PSP producen los mismos efectos tóxicos y que en las especies que eran características de contener PSP se esté detectando TTX,

hace que las intoxicaciones debidas a TTX puedan ser erróneamente atribuidas a PSP. Además, en el caso de la TTX aún no se han establecido límites reglamentarios y no hay un método oficial para su detección.

Debido a estas razones, es importante la existencia de métodos capaces de identificar y distinguir ambos grupos de biotoxinas marinas. El MBA ha sido muy usado pero no es completamente satisfactorio porque no tiene la capacidad de distinguir entre TTX y las PSP [155]. Algunos autores [280, 281] evidenciaron la capacidad del método de Oshima [229] de detectar simultáneamente ambos grupos de toxinas, pero al igual que ocurre con las PSP, no son analizadas en una sola inyección. El método HPLC-FLD con oxidación post-columna y columna de carbono grafitizado poroso presentado en este trabajo, es capaz de detectar e identificar TTX junto con 13 análogos del grupo de las PSP en un sólo análisis. La única modificación que requiere es un ligero cambio en las condiciones del gradiente inicialmente descrito para separar las toxinas PSP, debido al solapamiento entre dcNEO y TTX. Se consiguió una separación cromatográfica buena de todas las toxinas y de este modo se ofrece la posibilidad de identificar correctamente TTX con respecto a las PSP (Tabla 6). Los valores de LOD y LOQ obtenidos en este trabajo para la TTX se consideran demasiado altos si se comparan con la técnica LC-MS/MS [155]. Esto es debido a que no se emplearon las longitudes ni de excitación ni de emisión idóneas para esta toxina sino que se trabajó en el rango adecuado para las toxinas PSP, pero pese a esta desventaja el método HPLC-FLD presentado es el primero que permite la detección de ambos grupos de toxinas en un sólo análisis.

Tabla 6. Resumen de las mejoras del método propuesto frente al método oficial de la AOAC 2011.12 (PCOX)

	PCOX	Método HPLC-FLD propuesto
Nº columnas LC	2 columnas	1 única columna
Inyecciones por columna	600 inyecciones	6.000 inyecciones
Preparación de la muestra	Sencilla y rápida	Sencilla aunque se añade un paso de limpieza con SPE de PGC
Tiempo de análisis completo	24 min x 2 = 48 min	37 min
Nº de análogos STX validados	12 análogos (excluye dcNEO)	13 análogos (incluye dcNEO)
Capaz de detectar TTX	No	Sí
Cromatografía	Sencilla	Sencilla
Interpretación de los resultados	Dificultad intermedia	Fácil

En los últimos años se ha producido un claro incremento en el uso de la técnica LC-MS/MS para el análisis de biotoxinas marinas, de hecho para la mayoría de los grupos de biotoxinas marinas los métodos oficiales se basan en la técnica analítica LC-MS/MS. El incremento en la popularidad de LC-MS/MS está presente en todos los campos analíticos de investigación. Es empleada tanto para la detección y determinación de nuevas estructuras como en aplicaciones rutinarias. En el caso de las PSP los métodos basados en LC-MS/MS y su aplicación en programas de monitoreo de moluscos están todavía en una fase muy temprana. Cada vez son más los métodos basados en esta técnica recogidos en la bibliografía [260-262, 282-285], aunque HPLC-FLD sigue siendo hoy en día la técnica empleada en aquellos métodos exitosamente validados para la detección de las PSP.

Los altos límites de detección, las sales presentes en los extractos de moluscos que provocan variaciones importantes en los tiempos de retención de las toxinas, la presencia de un elevado número de picos de interferencias en los cromatogramas cuando se analizan extractos de molusco y que la fase móvil utilizada en HPLC-FLD no sea compatible con la detección por espectrometría de masas, son los principales problemas encontrados para el uso de LC-MS/MS bajo las condiciones empleadas en el análisis con oxidación post-columna en fase reversa [286].

En el presente trabajo se desarrolla un método químico que por primera vez permite la determinación de las PSP, tanto hidrófilas como hidrófobas, junto a TTX y su análogo 4,9 anhTTX por LC-MS/MS usando una columna Hypercarb®. El tiempo de análisis necesario fue de 20 minutos y el método fue validado con éxito para las principales matrices de interés (mejillón, almeja, vieira y ostra).

El uso de condiciones de fase reversa, empleadas en HPLC-FLD, que generalmente consisten en bajos porcentajes de disolventes orgánicos y reactivos de par iónico, no son compatibles con LC-MS/MS. En el método propuesto tanto la columna como la fase móvil empleada para la elución de las toxinas son similares a las descritas en el método HPLC-FLD desarrollado anteriormente [287]. Se encontró como inconveniente la supresión de la señal debido al empleo de TFA, puesto que dicho compuesto forma pares iónicos con los analitos. Varios autores [288, 289] habían desarrollado previamente métodos para aumentar la señal cuando este aditivo fuese empleado, y en nuestro caso funcionó correctamente.

Las interferencias que las matrices de moluscos provocaron cuando se empleó la técnica LC-MS/MS sugirió la necesidad de un proceso de limpieza extensivo de las muestras para eliminar la gran cantidad de sales que poseen, que provocan grandes variaciones en los tiempos de retención de las toxinas, y los picos de interferencias debidos a la propia matriz. Trabajos anteriores [261] [262] habían aportado grandes mejoras en este campo, con la introducción de distintos procesos de limpieza de las muestras previos a su análisis basados en la extracción en fase sólida. El procedimiento de limpieza de las muestras descrito en el método que se presenta es el mismo que el que se empleó para el tratamiento de las muestras previo a su análisis por HPLC-FLD con columna Hypercarb [287] (Figura 21). Se hicieron varias pruebas para comprobar si era necesario realizar los tres pasos del procedimiento de limpieza (desproteización, extracción con diclorometano y cartucho SPE de PGC) y se obtuvieron los mejores resultados de este modo. Este tratamiento mostró excelentes resultados para la retención selectiva y elución tanto de las PSP como de las TTXs en muestras complejas de bivalvos, por lo que resultó ser muy útil para minimizar los efectos de la matriz tras su análisis por LC-MS/MS. Aunque la limpieza descrita por Boundy y col. [262] (Figura 20) es más corta, puesto que sólo aplica los cartuchos SPE de PGC, el método propuesto presenta la importante ventaja de que no es necesario diluir las muestras en acetonitrilo antes de su análisis, lo que es determinante a la hora de analizar muestras con bajas cantidades de toxinas. Además esta limpieza permitió reducir considerablemente el efecto de las

interferencias propias de los extractos de molusco, dando lugar a una excelente línea base y como consecuencia los parámetros de validación en términos de repetibilidad, límites de detección y cuantificación y recuperación del analito fueron muy satisfactorios. Todos los valores de los LOD obtenidos se encuentran 10 veces por debajo del límite legal establecido para las PSP ($800 \mu\text{g STX} \cdot \text{diHCl eq/ kg}$), lo que sugiere que el método propuesto tiene un gran potencial para ser utilizado para análisis rutinario de moluscos en programas de monitoreo. Por lo tanto en esta Tesis Doctoral se presenta un tipo de columna y un protocolo de limpieza de muestras que funciona tanto para HPLC-FLD como para LC-MS/MS.

Otra de las ventajas que presenta este nuevo método es la capacidad de detectar y separar correctamente las toxinas PSP pertenecientes al grupo de las GCs. La extensión de los métodos analíticos para abarcar nuevas toxinas es hoy en día de vital importancia. Este nuevo grupo de toxinas PSP fue aislado y caracterizado inicialmente en aguas australianas, pero en los últimos años se ha observado su amplia distribución a lo largo de todo el mundo, especialmente Portugal, España y China, donde tienen una importante contribución en el perfil tóxico [183]. Por lo tanto en estas zonas donde aparecen estas toxinas es especialmente importante disponer de métodos analíticos que sean apropiados para su identificación y además deben ser incluidas en sus programas de monitoreo. El método oficial de Lawrence no resulta efectivo para la detección de estos compuestos, ya que debido a su carácter hidrófobo pueden quedar retenidos en las resinas C18 empleadas para la limpieza de los extractos. Además presentan largos tiempos de retención en comparación con los análogos hidrófilos, por lo tanto no son detectables cuando se aplican los métodos HPLC-FLD validados para las toxinas hidrófilas [183]. La detección por espectrometría de masas es sugerida por varios autores [183, 290] como una buena herramienta para las toxinas GCs. El método LC-MS/MS que se muestra en la presente Tesis Doctoral, es capaz de separar las toxinas PSP, tanto de carácter hidrófilo como hidrófobo, y la TTX y su análogo 4,9-anhTTX en un sólo análisis de 20 minutos. No fue posible validar el método para el grupo de toxinas GCs debido a la falta de estándares analíticos comerciales. El reducido conocimiento sobre la toxicidad de estos analitos de reciente descubrimiento, pone de manifiesto la necesidad de continuar investigando el comportamiento de estas biotoxinas marinas. Aún así, el método que se propone supone un avance importante para el desarrollo e implementación del análisis de toxinas PSP tanto hidrófilas como hidrófobas, conjuntamente con TTXs, en un tiempo corto por LC-MS/MS.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Las diferentes matrices de moluscos bivalvos tiene gran impacto en la separación de las toxinas PSP mediante el empleo del método PCOX.
2. La reacción de transformación de GTX4 a NEO mediante el empleo de 2-ME como agente reductor, puede llevarse a cabo en un sólo paso lo que supone una herramienta rápida, sencilla y fiable para la identificación y cuantificación de GTX4.
3. El empleo del método PCOX es una buena opción para la identificación y cuantificación de las PSP puesto que genera resultados precisos y fiables.
4. El método HPLC-FLD con oxidación post-columna, basado en el empleo de la columna Hypercarb®, es capaz de detectar e identificar TTX junto con 13 análogos de las PSP en un sólo análisis, demostrando su utilidad como método con fines regulatorios.
5. El procedimiento de limpieza mediante el empleo de cartuchos SPE Hyperseb Hypercarb® mostró excelentes resultados tanto para el método HPLC-FLD como para el método LC-MS/MS con columna de carbono grafitizado poroso.
6. El método LC-MS/MS con columna Hypercarb® permite por primera vez en un método químico separar las PSP, tanto hidrófilas como hidrófobas, junto con TTX y su análogo 4,9-anhTTX, en un tiempo de análisis corto.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gago-Martínez, A.I., I. Ruppén, and J. Hungerford, *Biotoxinas marinas*, in *Toxicología Alimentaria*, A. Cameán and M. Repetto, Editors. 2006, Ed. Díaz de Santos: Madrid. p. 141-172.
2. Oliveira, M.M., A.S. Camanho, and M.B. Gaspar, *The phycotoxins' impact on the revenue of the Portuguese artisanal dredge fleet*. *Marine Policy*, 2014. **52**: p. 45-51.
3. Sournia, A., M.J. Chretiennot-Dinet, and M. Ricard, *Marine phytoplankton: how many species in the world ocean?* *J Plankton Res*, 1991. **13**: p. 6.
4. Hallegraeff, G.M., *Harmful algal blooms: a global overview*, in *Manual on harmful marine microalgae*, G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, and A.D. Cembella, Editors. 2003, IOC-UNESCO: Paris. p. 24.
5. Gerald Plumley, F., *Marine algal toxins: Biochemistry, genetics and molecular biology*. *Limnol Oceanogr*, 1997. **42**(5): p. 12.
6. Turner, J.T. and P.A. Tester, *Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers and pelagic food webs*. *Limnol Oceanogr*, 1997. **42**(5): p. 11.
7. Wright, J.L.C. and A.D. Cembella, *Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins*, in *Physiological ecology of harmful algal blooms*, D.M. Anderson, A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff, Editors. 1998, Springer-Verlag: Heidelberg. p. 25.
8. Baden, D.G. and V.L. Trainer, *Mode of action of toxins of seafood poisoning*, in *Algal toxins in seafood and drinking water*, I.A. Falconer, Editor. 1993, Academic Press: London. p. 25.
9. Quilliam, M.A., *The role of chromatography in the hunt for red tide toxins*. *J Chromatogr A*, 2003. **1000**: p. 21.
10. Bates, S.S., et al., *Pennate diatom Nitzschia pungens as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada*. *Can J Fish Aquat Sci*, 1989. **46**: p. 12.
11. Di Liberto, T. *Record-setting bloom of toxic algae in North Pacific*. 2015 [cited 2015 August 6]; Available from: <https://www.climate.gov/news-features/event-tracker/record-setting-bloom-toxic-algae-north-pacific>.
12. Zabaglo, K., et al., *Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review*. *Algal Research*, 2016. **13**: p. 7.

13. Walter, J.A., D.M. Leek, and M. Falk, *NMR study of the protonation of domoic acid*. Can J Chem, 1992. **70**: p. 5.
14. La Barre, S., S.S. Bates, and M.A. Quilliam, *Domoic acid*, in *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*, S. La Barre and J.M. Kornprobst, Editors. 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA: Germany. p. 189-216.
15. Clayden, J., B. Read, and K.R. Hebditch, *Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues*. Tetrahedron, 2005. **61**: p. 11.
16. Kumar, K.P., S.P. Kumar, and G.A. Nair, *Risk assessment of the amnesic shellfish poison, domoic acid, on animals and humans*. J Environ Biolo, 2009. **30**: p. 6.
17. Larm, J.A., P.M. Beart, and N.S. Cheung, *Neurotoxin domoic acid procedures cytotoxicity via kainate- and ampa-sensitive receptors in cultured cortical neurones*. Neurochem Int, 1997. **31**: p. 5.
18. Ramsdell, J.S., *The molecular and integrative basis to domoic acid toxicity*, in *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, L.M. Botana, Editor. 2007, Blackwell Publishing Professional: Cambridge. p. 223-250.
19. Hampson, D.R., et al., *Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain*. Eur J Pharmacol, 1992. **218**: p. 8.
20. Pulido, O.M., *Domoic acid toxicologic pathology: a review*. Mar Drugs, 2008. **6**: p. 39.
21. Costa, L.G., G. Giordano, and E.M. Faustman, *Domoic acid as a developmental neurotoxin*. Neurotoxicology, 2010(31): p. 14.
22. Perl, T.M., et al., *An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid*. N Engl J Med, 1990. **322**: p. 5.
23. EFSA, *Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-domoic acid*. Eur Food Safety Authority J, 2009. **1181**: p. 61.
24. Trainer, V.L., et al., *Pseudo-nitzschia physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health*. Harmful Algae, 2012. **14**: p. 30.
25. Wekell, J.C., et al., *Occurrence of domoic acid in Washington state razor clams (*Siliqua patula*) during 1991-1993*. Nat Toxins, 1994. **2**: p. 8.

26. AOAC, *Official method 959.08. Paralytic shellfish poison: biological method. First action, 1959. Final action, Sec. 49.10.01*, in *Official methods of analysis*, W. Horwitz, Editor. 2005, AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
27. Barbaro, E., et al., *Fast and sensitive metho for determination of domoic acid in mussel tissue*. The Scientific World Journal, 2016: p. 6.
28. Quilliam, M.A., M. Xie, and W.R. Hardstaff, *Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood*. J AOAC Int, 1995. **78**(2): p. 11.
29. AOAC, *Official Method 991.26. Domoic acid in mussels, liquid chromatography method*, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, W. Horwitz, Editor. 2000, AOAC International: Gaithersburg, Maryland, USA.
30. AOAC, *Official Method 2006.02*, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, A. International, Editor. 2006: Gaithersburg, MD, USA.
31. Korringa, P. and R.T. Roskam, *An Inusual Case of Mussel Poisoning*. C.M/ Shellfish Committee International Council for the Exploration of the Sea: Copenhagen, Denmark, 1961.
32. Lembeye, G., et al., *DSP Outbreak in Chilean Fjords*, in *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, T.J. Smayda and Y. Shimizu, Editors. 1993, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. p. 525-529.
33. Reguera, B., et al., *Dinophysis Toxins: Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish*. Mar Drugs, 2014. **12**: p. 67.
34. Fernández, J.J., et al., *Identification of new okadaic acid derivatives from laboratory cultures of Prorocentrum lima*. J Nat Prod, 2003. **66**: p. 2.
35. Cruz, P.G., et al., *19-epi-Okadaic acid, a novel protein phosphatase inhibitor with enhanced selectivity*. Org Lett, 2007. **9**: p. 3.
36. Paz, B., et al., *Identification of 19-epi-okadaic acid, a new diarrhetic shellfish poisoning toxis, by liquid chromatography with mass specyrometry detection*. Mar Drugs, 2008. **6**: p. 6.
37. Cruz, P.G., et al., *Belizeanic acid: a potent protein phosphatase 1 inhibitor belonging to the okadaic acid class, whit an unusual skeloton*. Chem Eur J, 2008. **14**: p. 8.

38. Van de Heuvel, J.P., *Xenobiotic receptor systems. Introduction and overview*, in *Comprehensive Toxicology*, J.P. Vanden Heuvel, et al., Editors. 2002, Elsevier Science BV: Amsterdam.
39. Daranas, A.H., et al., *Selg-association of okadaic acid as a pathway to the cell*. *Org Lett*, 2007. **9**: p. 3.
40. Cohen, P., C.F.B. Holmes, and Y. Tsukitani, *Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation*. *Trends Biochem Sci*, 1990. **15**: p. 4.
41. Aune, T. and M. Yndestad, *Diarrhetic shellfish poisoning*, in *Algal toxins in seafood and drinking water*, L.A. Falconer, Editor. 1993, Academic Press: London. p. 27.
42. Van Egmond, H.P., et al., *Paralytic and diarrhetic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation*. *J Nat Toxins*, 1993. **2**: p. 42.
43. Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, and A.D. Cembella, *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides. Vol. 33. 1995, Paris: IOC of UNESCO.
44. Dominguez, H.J., et al., *Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications*. *Toxicon*, 2010. **56**: p. 26.
45. Murakami, Y., Y. Oshima, and T. Yasumoto, *Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate, Prorocentrum lima*. *Japanese Society of Fisheries Science*, 1982. **48**: p. 3.
46. Yasumoto, T., et al., *Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning*. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 1980. **46**(11): p. 6.
47. Fernández-Puente, P.e.a., *Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, Dinophysis acuta, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry*. *Toxicon*, 2004. **44**: p. 7.
48. Carmody, E.P., K.J. James, and S.S. Kelly, *Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland*. *Toxicon*, 1996. **34**: p. 8.
49. Blanco, J., et al., *From Dinophysis spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels*, in *Harmful Marine Algal Blooms*, P. Lassus, et al., Editors. 1995, Lavoisier Intercept Ltd.: Paris. p. 777-782.
50. Suzuki, T., et al., *Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay*. *Fisheries Science*, 2005. **71**(6).

51. European Food Safety, A., *Marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain*. EFSA Journal, 2008. **6**(1): p. 589-n/a.
52. EU, *Commission Regulation (EU) No 15/2011 of January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs*. Official Journal of the European Union, 2011. **L6:3**.
53. EU, *Commision Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin*. Off J Eur Union, 2004. **L139**: p. 55-255.
54. Randall, J.E., *A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause*. Bull Mar Sci, 1958. **8**: p. 31.
55. Murata, M., A.M. Legrand, and T. Yasumoto, *A Probable partial structure of ciguatoxin isolated from the moray eel *Gymnothorax javanicus**. Tetrahedron Lett, 1989. **30**(29): p. 3.
56. Murata, M., et al., *Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor for the dinoflagellate *Gamberdiscus toxicus**. J Am Chem Soci, 1990. **112**(11): p. 6.
57. Lehane, L. and R.J. Lewis, *Ciguatera: recent advances but the risk remains*. Int J Food Microbiol, 2000. **61**(2-3): p. 34.
58. Dickey, R.W. and S.M. Plakas, *Ciguatera: a public health perspective*. Toxicon, 2010. **56**(2): p. 13.
59. Hamilton, B., et al., *Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin*. Toxicon, 2002. **40**(6): p. 8.
60. Andrew, E.B., et al., *Ciguatera*. J Toxicology: Clinical Toxicology, 1993. **31**(1): p. 29.
61. Hokama, Y., *Ciguatera fish poisoning*. J Clin Lab Anal, 1988. **2**(1): p. 6.
62. Grattan, L.M., S. Holobaugh, and J.G. Morris Jr, *Harmful algal blooms and public health*. Harmful Algae, 2016. **57**: p. 6.
63. Mattei, C., et al., *Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries*. Toxicon, 2014. **91**: p. 7.
64. Delgado, G., et al., *Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba*. Rev Biol Trop, 2006. **54**(2): p. 11.

65. Villareal, T.A., et al., *Pre-troleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico*. Harmful Algae, 2007. **6**(2): p. 6.
66. Bienfang, P., et al., *Ciguatera: the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon*. West Afr J Mar Sci, 2008. **30**(3): p. 7.
67. UE, *Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados a consumo humano*, in L 139/206, D.O.d.I.U. Europea, Editor. 2004.
68. EFSA, *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish- Emerging toxins: Ciguatoxin group. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)*. Eur Food Safety Authority J, 2010. **8**(6).
69. Yasumoto, T., et al., *Determinations of marine toxins in foods*. J AOAC Int, 1995. **78**: p. 8.
70. Moore, R.E. and G. Bartolini, *Structure of palytoxin*. J Am Chem Soci, 1981. **103**: p. 2491-2494.
71. Uemura, D., et al., *Further studies on palytoxin. II. Structure of palytoxin*. Tetrahedron Lett, 1981. **22**: p. 2781-2784.
72. Brissard, C., et al., *Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification*. J Chromatogr A, 2015. **1388**: p. 87-101.
73. García-Altare, M., et al., *The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from Ostreopsis cf. ovata (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MS (n.)*. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**: p. 1191-1204.
74. Habermann, E., *Palytoxin acts through Na⁺,K⁺-ATPase*. Toxicol, 1989. **27**: p. 1171-1187.
75. Stein, W.D., *Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium pump in the emergence of animal cells*. Int Rev Cytol, 2015. **215**: p. 231-258.
76. Riobó, P. and J.M. Franco, *Palytoxin: Biological and chemical determination*. Toxicol, 2011. **57**: p. 368-375.
77. Tubaro, A., et al., *Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure*. Toxicol, 2011. **57**(3): p. 478-495.

78. Moore, R.E. and P.J. Scheuer, *Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate*. Science, 1971. **172**: p. 495-498.
79. Ciminiello, P., et al., *Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian Palythoa subspecies*. Chem Res Toxicol, 2009. **22**: p. 1851-1859.
80. Gleibs, S., D. Mebs, and B. Werding, *Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef*. Toxicon, 1995. **33**: p. 1531-1537.
81. Ciminiello, P., et al., *Complex palytoxin-like profile of Ostreopsis ovata. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. **24**: p. 2735-2744.
82. Lenoir, S., et al., *First evidence of palytoxin analogues from an Ostreopsis mascarenensis (Dinophyceae) benthic bloom in south-western Indian Ocean*. J Phycol, 2004. **40**: p. 1042-1051.
83. Rossi, R., et al., *New palytoxin-like molecules in Mediterranean Ostreopsis cf ovata (Dinoflagellates) and in Palythoa tuberculosa detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry*. Toxicon, 2010. **56**: p. 1381-1387.
84. Ukena, T., et al., *Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate Ostreopsis siamensis*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**: p. 2585-2588.
85. Usami, M., et al., *Palytoxin analogs from the dinoflagellate Ostreopsis siamensis*. J Am Chem Soc, 1995. **117**: p. 5389-5390.
86. Aligizaki, K., et al., *Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art*. Toxicon, 2011. **57**(2011): p. 390-399.
87. Amzil, Z., et al., *Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to Ostreopsis cf. ovata blooms on the French Mediterranean coast*. Mar Drugs, 2012. **10**(2012): p. 477-496.
88. Ciminiello, P., et al., *Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of Ostreopsis cf. siamensis (Dinophyceae) by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*. Harmful Algae, 2013. **23**: p. 19-27.

89. Riobó, P., et al., *Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationship*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(2008): p. 2636-2647.
90. Fraga, M., et al., *Detection of palytoxin-like compounds by a flow cytometry-based immunoassay supported by functional and analytical methods*. Anal Chimica Acta 2016. **903**(2016): p. 1-12.
91. Yasumoto, T., et al., *Diarrhetic shellfish toxins*. Tetrahedron, 1985. **41**: p. 1019-1025.
92. Ishige, M., N. Satoh, and T. Yasumoto, *Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2)*. . Report from Hokkaido Institute of Health, 1988. **38**: p. 15-19.
93. Terao, K., et al., *Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1*. Toxicol, 1986. **24**(11): p. 1141-1151.
94. Edebo, L., et al., *Toxic mussels and okadaic acid induce rapid hypersecretion in the rat small intestine*. Apmis, 1988. **96**(7-12): p. 1029-1035.
95. Burgess, V. and G. Shaw, *Pectenotoxins—an issue for public health: a review of their comparative toxicology and metabolism*. Environment international, 2001. **27**(4): p. 275-283.
96. Blanco, J., A. Morono, and M.L. Fernández, *Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview*. Galician J. Mar. Resour, 2005. **1**: p. 70.
97. Draisci, R., L. Lucentini, and A. Mascioni, *Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and analysis*, in *Seafood and freshwater toxins*, L.M. Botana, Editor. 2002, Marcel and Dekker: New York. p. 289-320.
98. Lee, J.S., et al., *Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species*. Journal of Applied Phycology, 1989. **1**(2): p. 147-152.
99. MacKenzie, L., et al., *Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in Dinophysis acuta and Dinophysis acuminata from New Zealand*. Harmful Algae, 2005. **4**(1): p. 75-85.
100. Suzuki, T., et al., *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, 2003. **992**(1): p. 141-150.

101. Fernández, M.L., et al., *Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of Dinophysis caudata and Dinophysis acuta from the Galician Rías (NW Spain)*. *Toxicon*, 2006. **48**(5): p. 477-490.
102. Miles, C.O., et al., *A novel pectenotoxin, PTX-12, in Dinophysis spp. and shellfish from Norway*. *Chemical research in toxicology*, 2004. **17**(11): p. 1423-1433.
103. Paredes, I., et al., *Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union*. *Toxicon*, 2011. **58**(4): p. 336-354.
104. Lawrence, J., et al., *Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs*. Fisheries and Aquaculture Technical Paper. Vol. 551. 2011, Rome: FAO.
105. Murata, M., et al., *Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisonin*. *Tetrahedron Lett*, 1987. **28**(47): p. 5869-5872.
106. Munday, R., T. Aune, and J.P. Rossini, *Toxicology of the yessotoxins*, in *Seafood and Freshwater Toxins*, L.M. Botana, Editor. 2008, CRC Press, Taylor and Francis Group: London, UK. p. 371-380.
107. Miles, C.O., et al., *Evidence for numerous analogs of yessotoxin in Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 2005. **4**(6): p. 1075-1091.
108. Paz, B., et al., *Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview*. *Mar Drugs*, 2008. **6**(2): p. 73-102.
109. Ogino, H., M. Kumagai, and T. Yasumoto, *Toxicologic evaluation of yessotoxin*. *Natural Toxins*, 1997. **5**(6): p. 255-259.
110. Alfonso, A., M.R. Vieytes, and L.M. Botana, *Yessotoxin, a promising therapeutic tool*. *Mar Drugs*, 2016. **14**(2): p. 30-44.
111. Tubaro, A., et al., *Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice*. *Toxicon*, 2004. **43**(4): p. 439-445.
112. Paz, B., et al., *Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates Protoceratium reticulatum and Lingulodinium polyedrum in culture*. *Toxicon*, 2004. **44**: p. 251-258.
113. EU, *Commission Regulation (EU) No. 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs*. *Off J Eur Union*, 2013. **L220**: p. 14.

114. McMahon, T. and J. Silver, *West coast of Ireland; winter toxicity of unknown aetiology in mussels*. Harmful Algae News, 1996. **14**: p. 2.
115. Satake, M., et al., *Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, Mytilus edulis*. J Ame Chem Soc, 1998. **120**(38): p. 9967-9968.
116. Hess, P., et al., *Azaspiracid Toxins: Toxicological Profile*, in *Marine and Freshwater Toxins: Marine and Freshwater Toxins*, P. Gopalakrishnakone, et al., Editors. 2014, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 1-19.
117. Ofuji, K., et al., *Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, Mytilus edulis, involved in human intoxication in Ireland*. Natural toxins, 1999. **7**(3): p. 99-102.
118. Ofuji, K., et al., *Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2001. **65**(3): p. 740-742.
119. Rehmann, N., P. Hess, and M.A. Quilliam, *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, 2008. **22**(4): p. 549-558.
120. Krock, B., et al., *Structure Elucidation and in Vitro Toxicity of New Azaspiracids Isolated from the Marine Dinoflagellate Azadinium poporum*. Marine drugs, 2015. **13**(11): p. 6687-6702.
121. Flanagan, A.F., et al., *A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins*. Toxicon, 2001. **39**(7): p. 1021-1027.
122. Twiner, M.J., et al., *Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines*. Toxicon, 2005. **45**(7): p. 891-900.
123. Twiner, M.J., et al., *Comparative effects of the marine algal toxins azaspiracid-1,-2, and-3 on Jurkat T lymphocyte cells*. Chemical research in toxicology, 2012. **25**(3): p. 747-754.
124. Román, Y., et al., *Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets*. Cellular signalling, 2002. **14**(8): p. 703-716.
125. Alfonso, A., et al., *Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **346**(3): p. 1091-1099.

126. Vale, C., et al., *Cell Volume Decrease as a Link between Azaspiracid-Induced Cytotoxicity and c-Jun-N-Terminal Kinase Activation in Cultured Neurons*. Toxicological Sciences, 2010. **116**(1): p. 359.
127. Twiner, M.J., et al., *Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of HERG potassium channels*. Chemical research in toxicology, 2012. **25**(9): p. 1975-1984.
128. James, K.J., et al., *Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption*. Food additives and contaminants, 2004. **21**(9): p. 879-892.
129. Twiner, M.J., et al., *Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts*. Marine drugs, 2008. **6**(2): p. 39-72.
130. Krock, B., et al., *Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea*. Harmful Algae, 2009. **8**(2): p. 254-263.
131. Tillmann, U., et al., *Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins*. European Journal of Phycology, 2009. **44**(1): p. 63-79.
132. Furey, A., et al., *Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations*. Toxicon, 2010. **56**: p. 173-190.
133. Klontz, K.C., et al., *Mussel-associated azaspiracid intoxication in the United States*. Ann Intern Med, 2009. **150**.
134. Sun, P., et al., *Characterization of an epoxide hydrolase from the Florida red tide dinoflagellate, Karenia brevis*. Phytochemistry, 2016. **122**: p. 11-21.
135. Plakas, S.M. and R.W. Dickey, *Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish*. Toxicon, 2010. **56**: p. 137-149.
136. Baden, D.G., et al., *Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects*. Environmental Health Perspectives, 2005. **113**(5): p. 621-625.
137. Watkins, S.M., et al., *Neurotoxic shellfish poisoning*. Marine Drugs, 2008. **6**(3): p. 431-455.
138. EFSA, *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish- Emerging toxins: Brevetoxin group*. EFSA Journal, 2010. **8**(7): p. 29.
139. EFSA, *EFSA report on data collection: future directions*. EFSA Journal, 2010. **1533**: p. 1-53.

140. Otero, A., et al., *Cyclic Imines: Chemistry and Mechanism of Action: A review*. Chem Res Toxicol, 2011. **24**: p. 1817-1829.
141. Guéret, S.M. and M.A. Brimble, *Spiroimine shellfish poisoning (SSP) and the spirolide family of shellfish toxins: Isolation, structure, biological activity and synthesis*. Natural product reports, 2010. **27**(9): p. 1350-1366.
142. Kita, M., et al., *Symbioimine and neosymbioimine, amphoteric iminium metabolites from the symbiotic marine dinoflagellate Symbiodinium sp.* Bioorg Med Chem, 2005. **13**(17): p. 5253-5258.
143. Selwood, A., et al., *Portimine: A bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate Vulcanodinium rugosum*. Tetrahedron, 2013. **54**(35): p. 4705-4707.
144. Hu, T., et al., *Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish*. J Chem Soc Chem Commun, 1995.
145. García-Altres, M., et al., *Confirmation of pinnatoxins and spiroptides in shellfish and passive samplers from Catalonia (Spain) by liquid chromatography coupled with triple quadrupole and high-resolution hybrid tandem mass spectrometry*. Mar Drugs, 2014. **12**: p. 3706-3732.
146. Seki, T., et al., *Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, Gymnodinium sp.* Tetrahedron Lett, 1995. **36**(39): p. 7093-7096.
147. Zhen, S.Z., et al., *The isolation and bioactivities of pinnatoxin (in Chinese)*. Chinese J Mar Drugs, 1990. **33**: p. 33-35.
148. Rundberget, T., et al., *Pinnatoxins and spiroptides in Norwegian blue mussels and seawater*. Toxicon, 2011. **58**(8): p. 700-711.
149. Takada, N., et al., *Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve Pteria penguin*. Tetrahedron Lett, 2001. **42**: p. 3495-3497.
150. Munday, R., *Toxicology of Cyclic Imines: Gymnodimine, Spirolides, Pinnatoxins, Pteriatoxins, Prorocentrolid, Spiro-Prorocentrimine and Symbioimines*, in *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*, L.M. Botana, Editor. 2008, CRC Press. p. 581-594.

151. Torigoe, K., M. Murata, and T. Yasumoto, *Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, Prorocentrum lima*. J Am Chem Soc, 1988. **110**: p. 7876-7877.
152. Hu, T., et al., *Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting toxin from Prorocentrum maculosum*. J Nat Prod, 1996. **59**: p. 1010-1014.
153. Lu, C.K., et al., *Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from a benthic Prorocentrum sp. of Taiwan*. Tetrahedron Lett, 2001. **42**: p. 1713-1716.
154. EFSA, *European Food Safety Authority (EFSA), Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish- Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins)*. EFSA Journal, 2010. **8**: p. 1628-1667.
155. Bane, V., et al., *Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection*. Toxins, 2014. **6**(2): p. 693-755.
156. Rodríguez, P., et al., *First toxicity report of tetrodotoxin and 5, 6, 11-trideoxyTTX in the trumpet shell Charonia lampas lampas in Europe*. Anal Chem, 2008 **80**(14): p. 5622-5629.
157. Turner, A.D., et al., *Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014*. Euro Surveill, 2015. **20**(2): p. 2-8.
158. Vlamis, A., et al., *First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate Prorocentrum minimum*. Toxins, 2015. **7**: p. 1779-1807.
159. Chau, R., j.A. Kalaitzis, and B.A. Neilan, *On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin*. Aquat Toxicol, 2011. **104**: p. 61-72.
160. Yokoo, A., *Study on chemical purification of tetrodotoxin (3)-purification of spheroidine*. J Chem Soc Japan, 1950. **71**(11): p. 590-592.
161. Goto, T., et al., *Tetrodotoxin*. Tetrahedron, 1965. **21**(8): p. 2059-2088.
162. Woodward, R.B. and J. Gougoutas, *The structure of tetrodotoxin*. J Am Chem Soc, 1964. **86**: p. 5030-15030.
163. Yotsu-Yamashita, M., et al., *Effects of specific modifications of several hydroxyls of tetrodotoxin on its affinity to rat brain membrane*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(3): p. 1688-1696.

164. Kudo, Y., et al., *Isolation and structural determination of the first 8-epi-type tetrodotoxin analogs from the newt, *Cynops ensicauda popei*, and comparison of tetrodotoxin analogs profiles of this newt and the puffer fish, *Fugu poecilonotus**. Mar Drugs, 2012. **10**(3): p. 655-667.
165. Hille, B., *The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve*. J Gen Physiol, 1971. **58**: p. 599-619.
166. Moran, O., A. Picollo, and F. Conti, *Tonic and phasic guanidinium toxin-block of skeletal muscle Na channels expressed in Mammalian cells*. Biophys J, 2003. **84**: p. 2999-3006.
167. Kaneko, Y., G.K. Matsumoto, and Y. Hanyu, *TTX resistivity of Na channel in newt retinal neuro*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**: p. 651-656.
168. Fukuda, A. and A. Tani, *Records of puffer poisonings. Report 3*. Nippon Igaku Oyobi Kenko Hoken, 1941. **3528**: p. 7-16.
169. Noguchi, T. and O. Arakawa, *Tetrodotoxin-Distribution and Accumulation in Aquatic Organisms, and Cases of Human Intoxication*. Mar Drugs, 2008. **6**: p. 220-242.
170. Golani, D., *Distribution of Lessepsian migrant fish in the Mediterranean*. Ital J Zool, 1998. **65**: p. 95-99.
171. EU, *Reglamento (CE) n° 854/2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano*. Diario Oficial de la Unión Europea, 2004. **L139**: p. 206.
172. EFSA, *Scientific Opinion on risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods*. EFSA Journal, 2017. **15**(4): p. 4752-4817.
173. Shoji, Y., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Anal Biochem, 2001. **290**(1): p. 10-17.
174. Etheridge, S.M., *Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives*. Toxicon, 2010. **56**: p. 108-122.
175. Kodama, M., *Ecobiology, clasification and origin*, in *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, L.M. Botana, Editor. 2002, Marcel and Dekker: New York.

176. Schantz, E.J., et al., *Paralytic shellfish poison VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues*. J Am Chem Soc, 1957. **79**(19): p. 5230-5235.
177. Bordner, J., et al., *Structure of a crystalline derivative of saxitoxin. Structure of saxitoxin*. J Am Chem Soc, 1975. **97**: p. 6008-6012.
178. Schantz, E.J., et al., *Structure of saxitoxin*. J Am Chem Soc, 1975. **97**: p. 1238-1239.
179. Shimizu, Y., *Chemistry and mechanism of action*, in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, L.M. Botana, Editor. 2000, Marcel Dekker: New York, USA. p. 151-172.
180. Berlinck, R.G.S. and M.H. Kossuga, *Natural guanidine derivatives*. Nat Prod Rep, 2005. **22**: p. 516-550.
181. Wiese, M., et al., *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogues*. Mar Drugs, 2010. **8**(7): p. 2185-2211.
182. Negri, A.P., et al., *Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum**. Chem Res Toxicol, 2003. **16** (8): p. 1029-1033.
183. Vale, P., *Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2008. **1195**(1): p. 85-93.
184. Negri, A.P., et al., *Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum**. Harmful Algae, 2007. **6**: p. 774-780.
185. Wang, D.Z., *Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review*. Mar Drugs, 2008. **6**(2): p. 349-371.
186. Zhang, X., et al., *Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gate sodium channel*. Nature, 2012. **486**(7401): p. 130-134.
187. Gessner, B.D., et al., *Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks*. Toxicon, 1997. **35**(5): p. 711-722.
188. Mons, M.N., H.P. Van Egmond, and G.J.A. Speijers, *Paralytic Shellfish Poisoning: a Review*. RIVM Report388802 005, 1998.

189. García, C., et al., *Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords*. *Toxicon*, 2004. **43**: p. 149-158.
190. Suárez-Isla, B.A., *Saxitoxin and Other Paralytic Toxins: Toxicological Profile*. *Marine and Freshwater Toxins*, 2015: p. 23-41.
191. García, C., et al., *Human intoxication with paralytic shellfish toxins: clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine*. *Biol Res*, 2005. **38**: p. 197-205.
192. Hurley, W., et al., *Paralytic shellfish poisoning: a case series*. *West J Emerg Med*, 2014. **15**: p. 78-81.
193. Gessner, B.D., J.P. Middaugh, and G.J. Doucette, *Paralytic shellfish poisoning in Kodiak*. *Alaska West J Med*, 1997. **167**: p. 351-353.
194. FAO, *Marine Biotoxins. Paper 80*. FAO Food and Nutrition, Rome, 2004: p. 5-52.
195. Shumway, S.E., *A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture*. *J World Aquacul Soc*, 1990. **21**(2): p. 65-104.
196. Shumway, S.E., *Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve mollusks are not the only vectors*. *Rev Fish Sci*, 1995. **3**(1): p. 1-31.
197. Kellmann, R., O. Ploux, and B.A. Neilan, *Neurotoxic alkaloids from cyanobacteria*, in *Natural products-phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, K. Ramawat and J. Merillon, Editors. 2013, Springer: Berlin/Heidelberg. p. 39-83.
198. Fitzgerald, D.J., D.A. Cunliffe, and M.D. Burch, *Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia*. *Environ Toxicol*, 1999. **14**(1): p. 203-209.
199. Doucette, G.J., et al., *Bacterial interactions with harmful algal blooms species: bloom ecology, toxigenesis, and cytology*, in *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, D.M. Anderson, A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff, Editors. 1998, Springer: Verlag, Heidelberg. p. 619-647.
200. Kodama, M., G.J. Doucette, and D.H. Green, *Relationships between bacteria and harmful algae*, in *Ecology of Harmful Algae*. 2006, Springer: Verlag, Berlin. p. 243-255.
201. Nakamura, M., Y. Oshima, and T. Yasumoto, *Occurrence of saxitoxin in puffer fish*. *Toxicon*, 1984. **22**(3): p. 381-385.

202. Shumway, S.E. and A.D. Cembella, *The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries*. Rev Fish Sci, 1993. **1**: p. 121-150.
203. Shumway, S.E., et al., *Accumulation of paralytic shellfish toxins by surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1897) in the Gulf of Maine: seasonal changes, distribution between tissues, and notes on feeding habits*. Nat Toxins, 1994. **2**: p. 236-251.
204. Landsberg, H., *Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection?* J Shellfish Res, 1996. **15**(2): p. 203-230.
205. Bricelj, V.M. and S.E. Shumway, *Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation*. Rev Fish Sci, 1998. **6**: p. 315-383.
206. Choi, M.C., et al., *Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from clams (*Ruditapes philippinarum*) to gastropods (*Nassarius festivus*)*. Chemosphere, 2006. **64**(10): p. 1642-1649.
207. Kotaki, Y., et al., *Identification of a calcareous red alga as the primary source of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and gastropods*. Bull Japan Soc Sci Fish, 1983. **49**(2): p. 283-286.
208. Sephton, D.H., et al., *Paralytic shellfish toxins in zooplankton, mussels, lobsters, and caged Atlantic salmon, *Salmo salar*, during a bloom of *Alexandrium fundyense* off Grand Manan Island, in the Bay of Fundy*. Harmful Algae, 2007. **6**: p. 745-758.
209. White, A.W., *Sensitivity of marine fishes to toxins from the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* and implications for fish kills*. Mar Biol, 1981. **65**(3): p. 255-260.
210. Castonguay, M., et al., *Accumulation of PSP toxins in Atlantic mackerel: seasonal and ontogenetic variations*. J Fish Biolo, 1997. **50**: p. 1203-1213.
211. Suárez-Isla, B.A., *Paralytic Shellfish Toxins, Pharmacology, and Toxicology Biological Detection Methods*, in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, L.M. Botana, Editor. 2008, CRC Press: E.E.U.U. p. 197-206.
212. Sauer, U.G., *Animal vs. non-animal tests for the monitoring of marine biotoxins in the EU*. Altex, 2004. **22**(1): p. 19-24.
213. EU, *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes*. Off J Eur Union, 2010.

214. EU, *Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005, laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from the Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004*. Off J Eur Union, 2005.
215. Vieites, M.R., et al., *Solid-phase radioreceptor assay for paralytic shellfish toxins*. Anal Biochem, 1993. **211**(1): p. 87-93.
216. AOAC, *AOAC Official method 2011.27. Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) in shellfish, receptor binding assay*, in *AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International*, A. International, Editor. 2011, AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
217. Davio, S.R. and P.A. Fontelo, *A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin*. Anal Biochem, 1984. **141**(1): p. 199-204.
218. Doucette, G.J., et al., *Development and preliminary validation of a microtiter plate-based receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins*. Toxicon, 1997. **35**(5): p. 625-636.
219. Powell, C.L. and G.J. Doucette, *A receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins: recent advances and applications*. Nat Toxins, 1999. **7**(1): p. 393-400.
220. Cusick, K.D. and G.S. Sayler, *An Overview on the Marine Neurotoxin, Saxitoxin: Genetics, Molecular Targets, Methods of Detection and Ecological Functions*. Mar Drugs, 2013. **11**(1): p. 991-1018.
221. Chu, F.S., et al., *Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay*. J Agric Food Chem, 1996. **44**(12): p. 4043-4047.
222. Usleber, E., M. Donald, and M. Straka, *Comparison of enzyme immunoassay and mouse bioassay for determining paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish*. Food Addit Contam, 1997. **14**(2): p. 193-198.

223. Kasuga, F., Y. Harakudo, and K. Machii, *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for paralytic shellfish poisoning toxins*. J Food Hyg Soc Jpn, 1996. **37**(6): p. 407-410.
224. Turner, A.D., et al., *Testing and application of a refined rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins in UK shellfish*. Toxicon, 2015. **100**(1): p. 32-41.
225. Humpage, A.R., V.F. Magalhaes, and S.M. Froscio, *Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**: p. 1655-1671.
226. Fonfría, E.S., et al., *Paralytic Shellfish Poisoning Detection by Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors in Shellfish Matrixes*. Anal Chem, 2007. **79**(16): p. 6303-6311.
227. Campbell, K., et al., *Single laboratory validation of a surface plasmon resonance biosensor screening method for paralytic shellfish poisoning toxins*. Anal Chem, 2010. **82**(1): p. 2977-2988.
228. Bates, H.A. and H. Rapoport, *A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison*. J Agric Food Chem, 1975. **23**: p. 237-239.
229. Oshima, Y., *Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins*. J AOAC Int, 1995. **78**(2): p. 528-532.
230. Rourke, W.A., et al., *Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue*. Food Chem Cont, 2008. **91**(3): p. 589-597.
231. Lawrence, J.F. and C. Menard, *Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation*. J Assoc Off Anal Chem, 1991. **74**(6): p. 1006-1012.
232. Lawrence, J.F., C. Menard, and C. C., *Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish*. J AOAC Int, 1995. **78**(2): p. 514-520.
233. Lawrence, J.F., B. Niedzwiadek, and C. Menard, *Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study*. J AOAC Int, 2005. **88**(6): p. 1714-1732.
234. AOAC, *Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish, prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection, first action 2005*,

- method 2005.06*, in *Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, A. International, Editor. 2006: Gaithersburg, MD.
235. Turner, A.D., et al., *Single laboratory validation of the AOAC LC method (2005.06) for mussels: Refinement and extension of the method to additional toxins*. J AOAC Int, 2009. **92**(1): p. 190-207.
236. Ben-Gigirey, B., M.L. Rodríguez-Velasco, and A. Gago-Martínez, *Extension of the validation of AOAC Official MethodSM 2005.06 for dcGTX2,3: Interlaboratory Study*. J AOAC Int, 2012. **95**(1): p. 111-122.
237. CRLMB, *Report on the study on the determination of PSP toxins in shellfish including GTX6 after hydrolysis (AOAC Official Method 2005.06)*. 2007, Vigo, Spain: CRLMB.
238. Turner, A.D. and R.G. Hatfield, *Refinement of AOAC 2005.06 liquid chromatography-fluorescence detection method to improve performance characteristics for the determination of paralytic shellfish toxins king and queen scallop*. J AOAC Int, 2012. **95**(1): p. 129-142.
239. Turner, A.D., *Validation of HPLC detection method for marine toxins*, in *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection* L.M. Botana, Editor. 2014, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 368-408.
240. DeGrasse, S.L., et al., *Pre- versus post-column oxidation liquid chromatography fluorescence detection of paralytic shellfish toxins*. Toxicon, 2011. **57**: p. 619-624.
241. Ben-Gigirey, B. and A. Villar-Rodríguez, *Chemical analysis*, in *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, L.M. Botana, Editor. 2008, CRC Press: Boca Raton, Florida.
242. Sullivan, J.J., *Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: a review*. J Shellfish Res, 1988. **7**: p. 587-595.
243. Oshima, Y., et al., *Dinoflagellate Gymnodinium Catenatum as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish*. Toxicon, 1987. **25**: p. 1105-1111.
244. Thielert, G., I. Kaiser, and B. Luckas, *HPLC determination of PSP toxins in Proceedings of symposium on marine biotoxins*, J.M. Fremy, Editor. 1991, Maison-Alfort: Paris. p. 121-125.
245. Hummert, C., et al. *A new method for the determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) in Proceeding of the 22nd International Symposium on Chromatography*. 1998. Rome, Italy.

246. Franco, J.M. and P. Fernández-Vila, *Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography, with postcolumn reaction and fluorimetric detection*. *Chromatographia*, 1993. **35**: p. 613-620.
247. Thomas, K., et al., *Molluscan Shellfish Safety*, in *The Marine Institute*, K. Henshilwood, et al., Editors. 2006: Galway, Ireland. p. 132-138.
248. Diener, M., et al., *Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FLD method*. *Eur Food Res Tech*, 2006. **224**(2): p. 147-151.
249. Asp, T.N., S. Larnes, and T. Aune, *Analysis of PSP toxins in Norwegian mussels by a post-column derivatization HPLC method*. *Toxicon* 2004. **43**: p. 319-327.
250. Van de Riet, J.M., et al., *Liquid chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops and oysters: Single-laboratory validation*. *Food Chem Cont*, 2009. **92**(6): p. 1690-1705.
251. Van de Riet, J.M., et al., *Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: Collaborative study*. *Food Biological Cont*, 2011. **94**(4): p. 1154-1177.
252. AOAC, *Official method 2011.02. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in mussels, clams, oysters and scallops. Post-column oxidation method (PCOX). First action 2011.* , in *Official Methods of Analysis A*. International, Editor. 2011: Gaithersburg, MD, USA.
253. AOAC, *Official method 2011.02. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in mussels, clams, oysters and scallops. Post-column oxidation method (PCOX). First action 2011.* , in *Official Methods of Analysis A*. International, Editor. 2012: Gaithersburg, MD, USA.
254. Costa, P.R., et al., *Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Island, Alaska*. *Toxicon*, 2009. **54**: p. 313-320.
255. Ben-Gigirey, B., et al., *A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA y HPLC official methods in shellfish*. *Toxicon*, 2012. **60**: p. 864-873.
256. Dell'Aversano, C., P. Hess, and M.A. Quilliam, *Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins*. *J Chromatogr A*, 2005. **1081**(2): p. 190-201.

257. Dell'Aversano, C., G. Eaglesham, and M.A. Quilliam, *Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2004. **1028**(1): p. 155-164.
258. Jaime, E., et al., *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography*. J Chromatogr A, 2001. **929**(1): p. 43-49.
259. Diener, M., et al., *Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins*. J Separ Sci, 2007. **30**: p. 1821-1826.
260. Turrell, E., et al., *Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry and development of solid-phase extraction for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins*. J AOAC Int, 2008. **91**(6): p. 1372-1386.
261. Sayfritz, S.J., J.A.B. Aasen, and T. Aune, *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection*. Toxicon, 2008. **52**: p. 330-340.
262. Boundy, M.J., et al., *Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction*. J Chromatogr A, 2015. **1387**: p. 1-12.
263. Van Dolah, F., *Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence*. Environ health persp, 2000. **108**(Suppl 1): p. 133-141.
264. Botana, L.M., et al., *How safe is safe for marine toxins monitoring?* Toxins, 2016. **8**: p. 208-223.
265. EFSA, *Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish-Pectenotoxin group*. EFSA Panel of Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA Journal, 2009. **1109**: p. 1-47.
266. EFSA, *Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish-Yessotoxin group*. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA Journal, 2008. **907**: p. 1-62.
267. AOAC, *Official Method 2005.06. Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. First Action 2005*, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, W. Horwitz, Editor. 2005, AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.

268. Li, A., et al., *Analysis of paralytic shellfish toxins and their metabolites in shellfish from the North Yellow Sea of China*. Food Addit Contam, 2012. **29**(9): p. 1455-1464.
269. UE, *Reglamento (CE) n° 854/2004 sobre la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano*. Diario Oficial de la Unión Europea, 2004. **L139**: p. 206.
270. Costa, P.R., et al., *Relevance and challenges in monitoring marine biotoxins in non-bivalve vectors*. Food Control, 2017. **76**: p. 24-33.
271. FAO, *Fishery and aquaculture statistics. Global capture production 1950-2013 (FishstatJ)*. FAO Fish Aquac Dep Rome, 2015. **Updat 2016**.
272. Sato, S., R. Sakai, and M. Kodama, *Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thiols*. Bioorg Med Chem Lett, 2000. **10**(16): p. 1787-1789.
273. Sakamoto, S., et al., *Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds*. Fish Sci, 2000. **66**(1): p. 136-141.
274. Ben-Gigirey, B., et al., *Influence of the sample toxic profile on the suitability of a high performance liquid chromatography method for official paralytic shellfish toxins control*. J Chromatogr A, 2007. **1140**: p. 78-87.
275. Baker, T.R., G.J. Doucette, and C.L. Powell, *GTX4 imposters: characterization of fluorescent compounds synthesized by Pseudomonas stutzeri SF/PS and Pseudomonas/Alteromonas PTB-1, symbionts of saxitoxin-producing Alexandrium spp*. Toxicon, 2003. **41**: p. 339-347.
276. Scientific, T., *Method development guide for Hypercarb Columns*. 2007, Runcorn, UK: Thermo Scientific.
277. Rey, V., et al., *Influence of different shellfish matrices on the separation of PSP toxins using a postcolumn oxidation liquid chromatography method*. Toxins, 2015. **7**(4): p. 1324-1340.
278. Katikou, P., et al., *First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish Lagocephalus sceleratus (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece)*. Toxicon, 2009. **54**: p. 50-55.
279. Zaki, M.A. and A.E.W. Mossa, *Red Sea puffer fish poisoning: Emergency diagnosis and management of human intoxication*. Egypt J Aquat Res, 2005. **31**: p. 370-378.

280. Hwang, D.F., et al., *Identification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning*. Fish Sci, 1995. **61**: p. 675-679.
281. Nagashima, Y., et al., *Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin (in shellfish and fish) by ion-pairing high performance liquid chromatography*. Bull Japan Soc Sci Fish, 1987. **53**: p. 819-823.
282. Halme, M., et al., *Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method*. J Chromatogr B, 2012. **880**: p. 50-57.
283. Lajeunesse, A., et al., *Detection and confirmation of saxitoxin analogues in freshwater benthic *Lyngbya wollei* algae collected in the St. Lawrence River (Canada) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2012. **1219**: p. 93-103.
284. Watanabe, R., et al., *Quantitative determination of paralytic shellfish toxins in cultured toxic algae by LC-MS/MS*. Food Addit Contam, 2013. **30**: p. 1351-1357.
285. Zhuo, L., et al., *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction*. Food Chem 2013. **137**: p. 115-121.
286. Gerssen, A., *Analysis of marine biotoxins by liquid chromatography mass spectrometric detection*, in *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, L.M. Botana, Editor. 2014, CRC Press: EEUU. p. 409-427.
287. Rey, V., et al., *Liquid chromatography with a fluorimetric detection method of analysis of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin based on a porous graphitic carbon column*. Toxins, 2016. **8**(7): p. 196-212.
288. Chan, C.C., et al., *Mitigation of signal suppression caused by the use of trifluoroacetic acid in liquid chromatography mobile phases during liquid chromatography/mass spectrometry analysis via post-column addition of ammonium hydroxide*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012. **26**: p. 1507-1514.
289. Kuhlmann, F.E., et al., *Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol*. J Am Soc Mass Spectrom, 1995. **6**: p. 1221-1225.

290. Costa, P.R., A. Robertson, and M.A. Quilliam, *Toxin profile of Gymnodinium catenatum (Dinophyceae) from the portuguese coast, as determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Mar Drugs, 2015. **13**: p. 2046-2062.