



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D. Brendán Vázquez Díaz**

**Estudio de la conversión de GTX2,3 en matrices de moluscos de  
origen gallego**

**Estudio da conversión de GTX2,3 en matrices de moluscos de  
orixe galega**

**Study of GTX2,3 conversion in molluscs matrices of galician  
origin**

Traballo Fin de Grao

*Junio 2025*

# Índice

Índice.....	2
Resumen.....	4
Resumo .....	5
Abstract .....	6
Abreviaturas .....	7
1 Introducción.....	8
1.1 Floraciones de algas nocivas (FAN) .....	8
1.2 Ficotoxinas .....	9
1.3 Toxinas paralizantes.....	11
1.4 Toxicidad de las toxinas PSP. ....	13
1.5 Métodos de determinación de toxinas PSP.....	15
1.5.1 Métodos químicos para determinación y análisis de toxinas PSP.....	15
1.6 Conversión de toxinas PSP. ....	17
2 Objetivos.....	21
3 Material y métodos .....	22
3.1 Reactivos .....	22
3.2 Método de Lawrence .....	22
3.2.1 Oxidación de muestras.....	24
3.3 Preparación de muestra .....	25
3.3.1 Extracción de muestras .....	27
3.3.2 Purificación de extractos .....	29
3.4 Conversión de toxinas PSP en relación al tiempo.....	29
4 Resultados y discusión.....	30
4.1 Intervalo de calibrado.....	30
4.2 Blancos experimentales. ....	33
4.3 Estudio de la conversión de GTX2,3 en almeja babosa .....	37
4.3.1 Prueba de detección y cuantificación .....	37
4.3.2 Conversión de toxinas PSP en relación al tiempo.....	38

4.3.3	Contaminación post-alicuotación .....	41
4.3.4	Estabilidad de GTX2,3 en la matriz.....	43
4.4	Estudio de la conversión de GTX2,3 en navaja .....	44
4.4.1	Conversión de toxinas PSP en relación al tiempo.....	44
4.4.2	Dependencia del porcentaje de conversión con la masa.....	46
5	Conclusiones .....	49
6	Bibliografía .....	50

## Resumen

Las ficotoxinas son compuestos tóxicos generados por microalgas en las floraciones de algas nocivas. Con el cambio climático, estas floraciones han aumentado su frecuencia de aparición e intensidad, acumulando grandes concentraciones de toxinas marinas en el agua, y afectando negativamente al resto de organismos presentes en el ecosistema. Entre las diversas ficotoxinas que producen las microalgas, destacan las PSP, unas de las neurotoxinas más potentes conocidas, que provocan al ingerirlas el síndrome paralizante de moluscos. Los humanos pueden sufrir esta intoxicación al consumir moluscos bivalvos que se encuentren en agua contaminada. Los moluscos filtran el agua, y en el proceso, retienen las toxinas PSP provocando que pueda ser letal su consumo. Por ello, hay una normativa europea de las PSP en alimentos marinos que establece las máximas concentraciones de toxinas que se pueden detectar en un molusco para un consumo seguro.

Sin embargo, detectar una toxina PSP en agua no implica que se vaya a detectar en el molusco recogido en ese medio. Hay evidencias de varias especies de moluscos bivalvos que son capaces de transformar en su matriz unas toxinas PSP en otras mediante procesos enzimáticos, por lo que resulta indispensable conocer qué transformaciones lleva a cabo cada especie para establecer su seguridad, desde el punto de vista del riesgo de ingestión durante el consumo de moluscos. En este trabajo, se analiza qué transformaciones llevan a cabo dos de las especies más comercializadas en Galicia, *Venerupis corrugata* y *Ensis magnus*. En concreto, se analiza la capacidad para transformar las toxinas GTX2,3, y los resultados obtenidos indican una diferencia notable entre los dos moluscos. En *Venerupis corrugata* no se encontraron indicios de transformación, mientras que en *Ensis magnus* se observó la conversión de GTX2,3 a C1,2, una transformación encontrada únicamente en dinoflagelados hasta el momento, pero no en otros moluscos.

**PALABRAS CLAVE:** gonyautoxinas 2 y 3 (GTX2,3), síndrome paralizante por moluscos (PSP), conversión de toxinas PSP, seguridad alimentaria, toxinas C1,2.

## Resumo

As ficotoxinas son compostos tóxicos xerados polas microalgas nas floracións de algas nocivas. Co cambio climático, estas floracións aumentaron a súa frecuencia de aparición e intensidade, acumulando grandes concentracións de toxinas mariñas na auga, e afectando negativamente ao resto dos organismos presentes no ecosistema. Entre as diversas ficotoxinas producidas polas microalgas, destacan as PSP, unhas das neurotoxinas máis potentes coñecidas, que provocan a síndrome paralítica dos moluscos ao ser inxeridas. Os humanos poden sufrir esta intoxicación ao consumir moluscos bivalvos que se atopan en augas contaminadas. Os moluscos filtran a auga e, no proceso, reteñen as toxinas PSP, facendo que o seu consumo sexa potencialmente letal. Por este motivo, existe unha normativa europea de PSP en produtos do mar que establece as concentracións máximas de toxinas que se poden detectar nun molusco para un consumo seguro.

Non obstante, detectar unha toxina PSP na auga non implica que se detecte no molusco recollido nese medio. Existen evidencias de varias especies de moluscos bivalvos que son capaces de transformar unhas toxinas PSP noutras na súa matriz mediante procesos enzimáticos, polo que é fundamental coñecer que transformacións realiza cada especie para establecer a súa seguridade, desde o punto de vista do risco de inxestión durante o consumo de moluscos. Neste traballo analizamos que transformacións realizan dúas das especies máis comercializadas en Galicia, *Venerupis corrugata* e *Ensis magnus*. En concreto, analízase a capacidade de transformar as toxinas GTX2,3, e os resultados obtidos indican unha notable diferenza entre os dous moluscos. En *Venerupis corrugata* non se atoparon signos de transformación, mentres que en *Ensis magnus* se observou a conversión de GTX2,3 a C1,2, unha transformación atopada ata agora só nos dinoflaxelados, pero non noutros moluscos.

**PALABRAS CHAVE:** gonyautoxinas 2 e 3 (GTX2,3), síndrome paralizante por moluscos (PSP), conversión de toxinas PSP, seguridade alimentaria, toxinas C1,2.

## Abstract

Phycotoxins are toxic compounds generated by microalgae in harmful algal blooms. With climate change, these blooms have increased their frequency of appearance and intensity, accumulating large concentrations of marine toxins in the water, and negatively affecting the rest of the organisms present in the ecosystem. Among the various phycotoxins produced by microalgae, PSP stand out, as some of the most powerful neurotoxins known, which cause paralytic shellfish poisoning when ingested. Humans can suffer this poisoning by consuming bivalve mollusks found in contaminated water. The bivalves filter the water, and in the process, they retain the PSP toxins, making their consumption potentially lethal. For this reason, there is a European regulation of PSP in seafood that establishes the maximum concentrations of toxins that can be detected in a mollusk, to guarantee a safe consumption.

However, detecting a PSP toxin in water does not imply that it will be detected in the mollusk collected in that medium. There is evidence of several species of bivalve mollusks that are capable of transforming some PSP toxins into others in their matrix through enzymatic processes, so it is essential to know what transformations each specie carries out to establish their safety, from the point of view of the risk of ingestion during the shellfish consumption. In this work, we analyze what transformations are carried out by two of the most commercialized species in Galicia, *Venerupis corrugata* and *Ensis magnus*. Specifically, the ability to transform GTX2,3 toxins is analyzed, and the results obtained indicate a notable difference between the two mollusks. In *Venerupis corrugata* no signs of transformation were found, while in *Ensis magnus* the conversion of GTX2,3 to C1,2 was observed, a transformation found only in dinoflagellates so far, but not in other mollusks.

**KEYWORDS:** gonyautoxins 2 and 3 (GTX2,3), paralytic shellfish syndrome (PSP), PSP toxins conversion, food safety, C1,2 toxins.

## Abreviaturas

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ANSES	Agencia Francesa para la Seguridad y Salud Alimentaria, Ambiental y Laboral
AZA	Azaspirácido
BTX	Brevetoxinas
DA	Ácido domoico
dcGTX	Decarbamoilgonyautoxina
dcneoSTX	Decarbamoilsaxitoxina
dcSTX	Decarbamoilsaxitoxina
DTX	Dinofisistoxina
EFSA	European Food Safety Authority
EURLMB	European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins
FAN	Floraciones de algas nocivas
GTX	Gonyatauxina
HILIC	Cromatografía líquida hidrofílica
HPLC-FLD	Cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia
LC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
MBA	Bioensayo en ratón
Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
OA	Ácido okadaico
PCOX	Oxidación post-columna
PRE-COX	Oxidación pre-columna
PSP	Intoxicación paralítica por moluscos
PST	Toxinas paralizantes de moluscos
TEF	Factor de toxicidad equivalente
YTX	Yesotoxina

# 1 Introducción

## 1.1 Floraciones de algas nocivas (FAN)

Las floraciones de algas son un incremento rápido y abundante de fitoplancton en agua dulce o salada. Se reconocen normalmente por la despigmentación normal del agua, y aunque suelen ser llamadas mareas rojas (“red tides”) su color puede variar también en verdes, naranjas y marrones, dependiendo de los fitopigmentos presentes en las células responsables de la floración. (Sarkar, 2018)

De las aproximadamente 5000 especies de algas marinas conocidas hasta el momento, se ha descubierto que unas 300 son capaces de crear floraciones, y, de estas, alrededor de 75 especies tienen la facultad de sintetizar ficotoxinas (Hallegraeff, 2003). Las algas capaces de producir estas biotoxinas conforman las floraciones de algas nocivas (FAN), y provocan cambios negativos en su entorno tales como hipoxia, degradación de la calidad del agua y alteración de la cadena trófica (Sarkar, 2018).

Las FAN han ido aumentando en frecuencia debido a factores ambientales y humanos. Por el factor humano, las FAN son normalmente resultado de un aumento excesivo de nutrientes (nitrógeno y fósforo) provenientes de residuos o contaminación (Watson et al., 2016). Por el factor ambiental, el cambio climático provoca climas más extremos como sequías más largas o tormentas más frecuentes, generando un estrés general en plantas que disminuye su capacidad de asimilar nutrientes, cuyo exceso termina contaminando aguas superficiales debido al transporte del agua de escorrentía (agua no absorbida que se mantiene en la superficie de la tierra). Por ello, el ser humano afecta directa e indirectamente a las FAN, provocando que sean más frecuentes y tengan una mayor duración (Beasley et al., 2023).

La mayoría de las veces las FAN son eventos monoespecíficos, por lo que identificar al organismo causante se vuelve prioritario para encontrar una solución. Entre las especies responsables más comunes encontramos dinoflagelados, cianobacterias y diatomeas, siendo los dinoflagelados los productores de la mayoría de las biotoxinas marinas conocidas. (Anderson et al., 2012).

Las FAN pueden afectar a organismos acuáticos de manera directa, a través de la ingestión de células por filtración o por depredación; o de manera indirecta, acumulando toxinas en el organismo por filtración de agua que contenga las mismas. Animales filtradores como

moluscos y bivalvos sufren exposición a las biotoxinas tanto por la ruta directa como indirecta, y al ser estos animales los primeros pasos en la cadena trófica junto con el propio fitoplancton, todo el ecosistema acaba siendo vulnerable a estas biotoxinas, siendo posible que los humanos puedan también intoxicarse (Turner et al., 2021).

## 1.2 Ficotoxinas

Las biotoxinas marinas o ficotoxinas, son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diferentes especies de microalgas, entre los que destacan diatomeas, cianobacterias y dinoflagelados. Estos últimos son los responsables de la producción de la mayor parte de las ficotoxinas conocidas. No son metabolitos esenciales para la supervivencia de la célula, sino que su función es mejorar la competencia por nutrientes e impedir la depredación (Cembella, 2003). Se puede clasificar a las ficotoxinas atendiendo a tres criterios: solubilidad, efecto tóxico y estructura química (Vilarino et al., 2018).

El principal riesgo que representan las ficotoxinas para los humanos es la intoxicación debido a la ingestión de moluscos contaminados, ya que estos compuestos se acumulan principalmente en estos animales, debido a que se alimentan mayoritariamente por filtración de agua. Además, no solo suponen un riesgo para la salud humana, sino que al poder afectar a peces y otros organismos presentes en el ecosistema pueden generar grandes pérdidas económicas en industrias pesqueras, o en acuíferos. Por ello se ha implementado una normativa europea rigurosa y se someten todos los productos marinos susceptibles de contaminación a protocolos de monitoreo para observar que no se sobrepasa el límite de concentración seguro (Otero & Silva, 2022).

En la Tabla 1 se observan las principales toxinas clasificadas por solubilidad (clasificación más utilizada hoy en día), y con sus características generales más importantes.

Tabla 1. Características de las principales toxinas hidrofílicas y lipofílicas.

	Grupo	Toxina referente (abreviatura)	Mecanismo de acción	Síntomas más significativos	Límites legales en la U.E.
Hidrofílicas	Toxinas paralizantes	Saxitoxina (STX)	Bloquean los canales de sodio dependientes de voltaje (Lehane, 2001)	Mareos, dolor de cabeza, parálisis, puede llegar a paro cardiorrespiratorio (Lehane, 2001)	0,8 mg/kg SM (Vale, 2014)
	Toxinas amnésicas	Ácido domoico (DA)	Activación de receptores de glutamato en células neurológicas (Pulido, 2008)	Vómitos, dolor abdominal, confusión, pérdida de memoria a corto plazo (Perl et al., 1990)	20 mg/kg SM (E.F.S. Authority, 2009)
Lipofílicas	Toxinas neurotóxicas	Brevetoxinas (BTX)	Activación de canales de sodio dependientes de voltaje. (Konoki et al., 2019)(Chain, 2010b)	Síntomas gastrointestinales generales, parestesia, ataxia, parálisis, estrés respiratorio (Watkins et al., 2008)	*
	Toxinas diarreicas	Ácido oxadaico (OA) y dinofisistoxina (DTX)	Inhiben la fosfatasa de serina/treonina 1, 2A y 3 (Blanco et al., 2005)	Diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal (Reguera et al., 2014)	0,16 mg/Eq SM (E.F.S. Authority, 2009)
	Azaraspirácidos	Azaspirácido (AZA)	Objetivo celular no definido, afectan a diferentes tipos celulares (Botana, 2014)	Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal (Twiner et al., 2005)	0,16 mg/Eq SM (E.F.S. Authority, 2009)
	Yesotoxinas	Yesotoxina (YTX)	Diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular (Alfonso et al., 2016)	Efectos en la absorción intestinal, cambios en la función cardiovascular (Botana, 2014)	1 mg Eq/kg SM (E.F.S. Authority, 2009)
	Iminas cíclicas	Gymnodimias y espirólidos	Inhiben receptores nicotínicos neuromusculares (Otero et al., 2011)	No se han notificado intoxicaciones humanas con estas toxinas (Chain, 2010a)	**

\*En la UE no hay límite legal, pero en 2018 se detectaron por primera vez estas toxinas en mejillones franceses, por lo que la Agencia Francesa para la Seguridad y Salud Alimentaria, Ambiental y Laboral estableció como una guía segura un valor de 0,18 mg BTX-3 /Eq por kilogramo de carne de molusco (Amzil et., 2021).

\*\*En la UE no hay límite legal al no haber identificado intoxicaciones relacionadas con estas toxinas. Sin embargo, debido a la presencia de una alta concentración de toxinas en almejas francesas, la Agencia Francesa para la Seguridad y Salud Alimentaria, Ambiental y Laboral estableció un límite de 0,023 mg Eq/kg de carnes de molusco (Arnich et al., 2020).

### 1.3 Toxinas paralizantes

Las toxinas paralizantes de moluscos, o toxinas PSP, constituyen un grupo de compuestos neurotóxicos responsables del síndrome de intoxicación por moluscos paralizante (PSP del inglés “Paralytic Shellfish Poisoning”). Son producidas principalmente por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (Wiese et al., 2010).

La incidencia de intoxicaciones por biotoxinas marinas varía entre 50.000 y 500.000 casos registrados al año en todo el mundo, con una incidencia de mortalidad global de aproximadamente 1,5% (Quod & Turquet, 1996). Sin embargo, la incidencia de intoxicación PSP es de unos 2000 casos anuales (Wang, 2008) con una mortalidad que varía entre menos del 1% y hasta el 8,5% dependiendo de si hablamos de casos en países desarrollados o subdesarrollados, respectivamente (Lehane, 2001).

La toxina PSP que se aisló primero fue la STX, y por ello es la máxima representante de este grupo. Se aisló por primera vez en 1957 de la almeja de mantequilla de Alaska (“*Saxidomus gigangteus*”), y, desde entonces, se han descubierto otros 57 análogos (Wiese et al., 2010) que se pueden clasificar en tres categorías atendiendo al grupo funcional presente en la cadena lateral R4 (Wang, 2008)

1. Toxinas carbamoil: en este subgrupo se incluyen la saxitoxina (STX), la neosaxitoxina (neoSTX) y las cuatro primeras gonyautoxinas (GTX1-GTX4)
2. Toxinas decarbamoil: en este subgrupo se incluyen la decarbamoil-saxitoxina (dcSTX), la decarbamoil-neosaxitoxina (dcneoSTX) y a su vez las cuatro primeras decarbamoil-gonyautoxinas (dcGTX1-dcGTX4)

3. Toxinas N-sulfocarbamoil: en este subgrupo se incluyen las gonyautoxinas GTX5 y GTX6 y las cuatro toxinas C (C1-C4)

Además de estos tres grupos se han descubierto recientemente otro subgrupo de toxinas con una cadena lateral de hidroxibenzoato, siendo denominadas toxinas GC (Negri et al., 2003). También se encontró un nuevo grupo de toxinas denominadas toxinas M en mejillones contaminados. Al principio se pensó que eran producto de la metabolización del resto de toxinas PSP, ya que no se encontró asociación alguna con especies de microalgas (Dell'Aversano et al., 2008). Sin embargo, gracias a la ayuda de la espectrometría de masas sensible, se ha conseguido encontrar trazas de toxinas M en cepas de *Alexandrium* spp. evidenciando que sí son toxinas naturales y no solamente productos metabólicos (Qui et al., 2018).

No incluimos estas toxinas con los otros tres grupos porque todavía no se han comprobado sus valores de toxicidad en humanos (Rey et al., 2023). En la Figura 1 se aprecian los análogos de STX agrupados por los sustituyentes de las cadenas laterales.

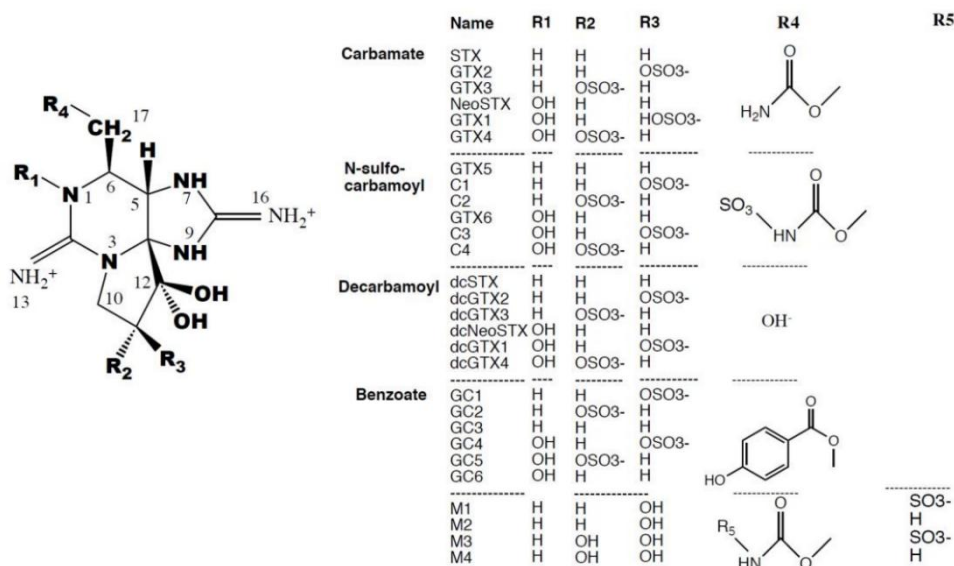


Figura 1. Estructura general de las toxinas PSP: la STX y sus análogos.

El síndrome PSP se produce porque las PST tienen alta afinidad con el sitio 1 de los canales de voltaje Na<sup>+</sup> dependientes (Van Dolah, 2000), y se unen a él de manera reversible, inhibiéndolos. De momento no hay antídoto para estas toxinas y el único tratamiento eficaz es respiración asistida y terapia de fluidos, hasta que las toxinas se liberen de los canales de forma natural mejorando la sintomatología (Wiese et al., 2010).

Los síntomas clásicos de intoxicación por toxinas PSP aparecen en la primera hora post-ingestión del molusco contaminado y están asociados a disfunciones del sistema nervioso periférico. Entre los síntomas más leves encontramos hormigueos y entumecimiento de extremidades, menor control psicomotriz, somnolencia e incoherencia (Halstead, 1965). En casos más graves, se llegaría a la parálisis muscular, pudiendo provocar parálisis respiratoria, shock cardiovascular, y, en último caso, la muerte del paciente (Lagos & Andrinolo, 2000).

A pesar de lo grave que es la intoxicación por toxinas PSP, si el tratamiento resulta eficaz y se actúa con rapidez, todos los pacientes, incluso aquellos que llegan a sufrir parálisis respiratoria, eliminan las toxinas PSP de su organismo en menos de 24 horas (Gessner et al., 1997). El órgano principal implicado en la detoxificación de toxinas PSP es el riñón, cuya implicación ya fue demostrada en otros animales, como gatos (Andrinolo et al., 1999) y ratones (Hines et al., 1993).

#### **1.4 Toxicidad de las toxinas PSP.**

La saxitoxina es una de las toxinas no proteicas más potentes que se conocen (Thottumkara et al., 2014). La dosis tóxica en humanos se estimó debido a intoxicaciones accidentales, ya que debido a las dificultades para la extracción y medición exacta de PSP es muy difícil obtener un valor exacto. Se estima entre 0,5-1,0 mg de STX la dosis letal para un humano de tamaño medio (Schantz, 1975), y se hace evidente la necesidad de detectar y controlar la presencia de toxinas como la STX al tener registros de especies de molusco que pueden llegar a acumular más de 20 mg de PSP por 100 g de carne (RaLonde, 1996).

Al ser la saxitoxina la referente de las toxinas PSP, la toxicidad del resto de análogos se comprobó con referencia a los valores de STX, por lo que la toxicidad de las toxinas PSP se suele expresar en factores de toxicidad equivalentes (TEFs), valores publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (E.Authority, 2009). Estos TEFs fueron definidos atendiendo a dos parámetros, el bioensayo en ratón (MBA) (Sommer & Meyer, 1937)

y el efecto que producen las PSP en los canales de sodio voltaje-dependientes (Vale et al., 2008)

Los mamíferos contienen normalmente múltiples isoformas de canales de sodio voltaje-dependientes, con diferentes sensibilidades a las toxinas PSP (Satin et al., 1992). La nomenclatura de las isoformas de los canales de sodio consiste en el símbolo químico del elemento sodio (Na), seguido de un subíndice que indica su función biológica (regulador de voltaje [v]) y un número correspondiente al identificador de la isoforma. Como hasta el momento se conocen nueve isoformas, la nomenclatura de los canales sería  $Na_v1$ - $Na_v9$  (Goldin et al., 2000).

Los TEF propuestos por la EFSA se refieren a resultados obtenidos con experimentos en cultivos celulares de neuronas de ratón (Perez et al., 2011). Sin embargo, el interés de conocer la toxicidad de la saxitoxina y sus análogos radica en la peligrosidad que supone la exposición de un consumidor a estos compuestos, por lo que en estudios posteriores se propusieron nuevos TEFs atendiendo a los efectos que producen estos compuestos en los canales de  $Na_v$  humanos de células HEK-93. Se estudiaron 7 canales ( $Na_v1.1$ - $Na_v1.7$ ) y se encontró una gran variabilidad de los TEFs dependiendo del subtipo de canal, aunque los subtipos  $Na_v 1.2$  y  $Na_v 1.6$  arrojan los resultados más parecidos a lo encontrado con estudios *in vivo*. Los estudios con  $Na_v 1.6$  tienen la equivalencia más fuerte con el MBA, mientras que los estudios con  $Na_v 1.2$  se correlacionan mejor con los resultados obtenidos en ratones tras ingestión oral (Alonso et al., 2016). En la Tabla 2 se observan tanto los TEFs proporcionados por la EFSA como los propuestos para los ensayos con los canales de voltaje  $Na_v 1.2$  y  $Na_v 1.6$ .

Tabla 2. Factores de toxicidad equivalentes (TEF) para STX y análogos según los estudios realizados por la EFSA o según efecto en los canales de sodio humanos  $Na_v 1.2$  y  $Na_v 1.6$ .

Toxina	TEFs por EFSA	TEFs por $Na_v 1.2$	TEFs por $Na_v 1.6$
STX	1,00	1,00	1,00
neoSTX	1,00	2,00	1,20
GTX1	1,00	0,54	1,40
GTX2	0,40	0,40	0,15
GTX3	0,60	0,40	0,15
GTX4	0,70	0,54	1,40
GTX5	1,00	0,01	0,11
GTX6	0,10	-	-
C2	0,10	0,01	0,09
C4	0,10	-	-

Tabla 2. Continuación.

dcSTX	<b>1,00</b>	<b>0,25</b>	<b>0,96</b>
dc-neoSTX	0,40	0,1	0,25
dcGTX2	0,20	0,05	0,02
dcGTX3	0,40	0,05	0,02
11-hidroxi-STX	0,30		

## 1.5 Métodos de determinación de toxinas PSP.

El primer método de análisis para la determinación de toxinas PSP fue desarrollado por Sommer y Meyer en 1937 (Botana et al., 2017). El método fue aprobado por la AOAC (McFarren, 1959) y consiste en la administración intraperitoneal en ratón de una toxina y dependiendo del tiempo de muerte del ratón frente a la dosis administrada crear una relación, para así poder cuantificar muestras problema (Sommer & Meyer, 1937).

El Bioensayo en Ratón (MBA) es un test rápido y con pocas interferencias, pero con problemas éticos evidentes por la muerte de un gran número de roedores (Hess et al., 2006). Por lo tanto, fue necesario investigar y desarrollar métodos de determinación diferentes, entre los que encontramos los métodos químicos, donde se encuentran tanto métodos cuantitativos (como el ensayo fluorimétrico), como métodos de análisis capaces de distinguir entre diferentes toxinas, con diversos ejemplos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia o acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

### 1.5.1 Métodos químicos para determinación y análisis de toxinas PSP.

#### 1.5.1.1 HPLC-FLD

La cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia o HPLC-FLD aprovecha que las toxinas PSP forman una purina al oxidarse en disolución alcalina, emitiendo fluorescencia en disolución ácida para cuantificar las toxinas de una muestra en relación a la señal fluorescente en lo que se llamaría ensayo fluorimétrico (Bates et al., 1978). Para poder identificar toxinas individualmente, se usó una separación cromatográfica previa a la detección,

que podía separar las toxinas después de ser oxidadas (PreCOX) o antes de ser sometidas al proceso de oxidación (PostCOX) (Luckas & Botana Luis, 2000).

Actualmente, el método HPLC-FLD con oxidación PreCOX, o método de Lawrence (Lawrence et al., 2005), es el método oficial de la AOAC para la determinación de toxinas PSP (Gaithersburg, 2006). El procedimiento consiste en homogeneizar la carne del molusco, realizar una extracción con ácido acético y purificar con una extracción en fase sólida. La oxidación se puede realizar con peróxido de hidrógeno y/o con peryodato de sodio dependiendo de la toxina o grupo de toxinas que se quieran identificar/cuantificar. Inicialmente, este método se validó para las toxinas STX, neoSTX, GTX2,3, GTX1,4, dcSTX, GTX5, C1,2 y C3,4 en especies de mejillones, almejas y ostras. Otras toxinas que se incluyeron en el método en años posteriores fueron dcNeo, dcGTX2,3 y GTX6 (Turner et al., 2009), (Begoña Ben-Gigirey et al., 2012).

El método HPLC-FLD con oxidación PCOX, a pesar de no ser el método oficial, es una alternativa al método de Lawrence validado por la AOAC (Van De Riet et al., 2011). Oshima consolidó las bases de la oxidación PCOX en 1995 (Yasukatsu Oshima, 1995), cuya diferencia principal con PreCOX radica en que la oxidación de las toxinas ocurre una vez salen separadas de la columna cromatográfica. Este proceso ocurre en una bobina de reacción, añadiendo después a la muestra un ácido fuerte para, por un lado, detener la reacción, y por otro obtener productos estables que puedan ser analizados por fluorescencia (López, 2017).

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

Los métodos de cromatografía líquida acoplados a espectrometría de masas (LC-MS) han evolucionado hasta convertirse en técnicas de referencia para la detección de toxinas PSP, gracias a tener una elevada sensibilidad y especificidad (Botana & López, 2015).

En 2005 se combinó la cromatografía líquida hidrofílica (HILIC), un método capaz de separar todo tipo de pequeñas moléculas polares (Buszewski & Noga, 2012), con la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (MS/MS) (Dell'Aversano et al., 2005). Este trabajo, junto con otros métodos desarrollados posteriormente, consiguieron aumentar la especificidad de los análisis además de reducir el tiempo necesario para la realización de los mismos, demostrando ser un método avanzado en la detección de toxinas PSP (Besbes et al., 2024).

### 1.5.1.3 Electroforesis capilar.

La electroforesis capilar con detección por absorción ultravioleta es una técnica alternativa para la separación y detección de toxinas PSP. Tiene ventajas frente a otros métodos como elevada eficiencia de análisis y alta resolución, y funciona gracias a que la mayoría de las toxinas PSP (excepto las pertenecientes al grupo C que tienen una carga neutra) tienen grupos funcionales susceptibles a ionización. Así, se pueden separar las moléculas en un campo eléctrico gracias a su diferente carga eléctrica y tamaño (Thibault et al., 1991).

## 1.6 Conversión de toxinas PSP.

Las toxinas PSP se acumulan en moluscos bivalvos por filtración de agua contaminada o por ingestión de células productoras de estos metabolitos. La capacidad de un molusco para filtrar y absorber sustancias varía sustancialmente entre especies (Bricelj, 1996), y también depende del estado de desarrollo del animal (edad) (Ortiz et al., 2019). Una vez ingeridas y absorbidas, las biotoxinas marinas pueden sufrir diferentes reacciones en la matriz biológica del molusco, provocando que la composición de toxinas PSP encontradas en una muestra biológica sea distinta a la encontrada en el agua contaminada de la que procede el animal (Y Oshima, 1995).

Las transformaciones a las que pueden ser sometidas las toxinas PSP son muy variables, y encontramos procesos como epimeración, oxidación, hidrólisis, desulfurilación y glucuronidación, entre otros (Leal & Cristiano, 2022). Todas estas posibilidades dan lugar a que los moluscos puedan transformar unas toxinas en otras, independientemente de las toxinas que se puedan detectar en el agua, haciendo necesario un estudio específico de cada molusco para que se pueda asegurar su seguridad para el consumo humano.

Hay varios mecanismos propuestos para explicar estas transformaciones. Las epimeraciones, por ejemplo, no requieren mediadores biológicos. Los epímeros  $\beta$  predominan como metabolitos producidos por las microalgas (Asakawa et al., 1995), mientras que en moluscos aumenta la proporción de epímeros  $\alpha$  con el tiempo de manera espontánea (Krock et al., 2007). Esta diferencia es muy útil, ya que puede ser usada como marcador temporal, midiendo el ratio de epímeros  $\alpha$  y  $\beta$  para estimar el tiempo que lleva el molusco acumulando toxinas (Bricelj & Shumway, 1998).

Otras conversiones son mediadas por enzimas, como las carbamoilasas, que convierten las toxinas N-sulfocarbamoiladas en sus correspondientes formas descarbamiladas, que son generalmente más tóxicas (Artigas et al., 2007). Además de las carbamoilasas, otras enzimas como sulfotransferasas, oxidorreductasas o glucuroniltransferasas también juegan un papel clave en la modificación de grupos funcionales (Leal & Cristiano, 2022).

Por último, se ha encontrado que bacterias presentes en el tracto digestivo de los moluscos pueden provocar también biotransformaciones. Como ejemplo de reacciones producidas por aislados bacterianos encontramos la conversión de GTX 2,3 a STX (Kotaki, 1989). En la Figura 2 se pueden observar las conversiones de conversión conocidas (flechas sólidas) y teorizadas (flechas discontinuas) entre los distintos análogos de STX.

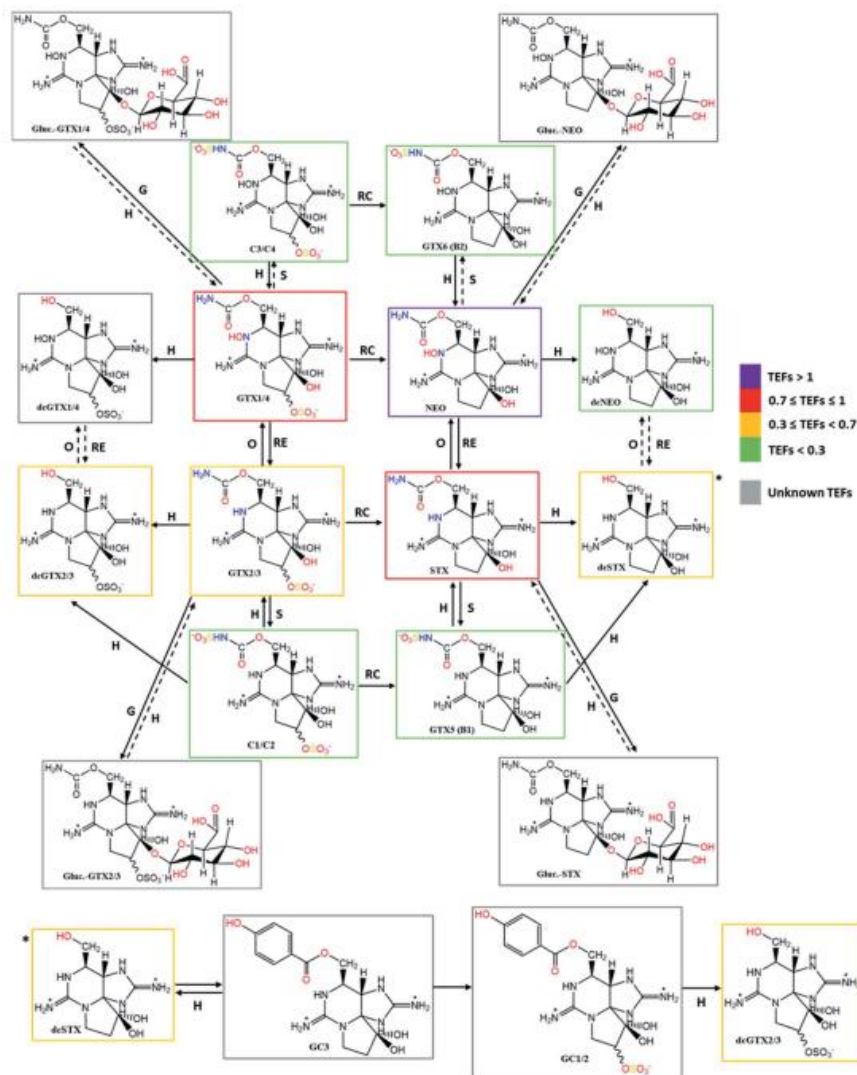


Figura 2. Resumen de las transformaciones conocidas entre las toxinas PSP.

La mayoría de reacciones de transformación de las PSP se han descrito para un número muy reducido de especies de bivalvos, aunque algunas especies particulares han muy estudiadas, ya ofrecen una variedad de transformaciones muy elevada, como la almeja *Spisula solida*. También encontramos que algunas especies de microalgas son productoras de una gran variedad de toxinas PSP, como el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (Leal & Cristiano, 2022).

Sin embargo, cada vez son más los investigadores que observan que la transformación de toxinas PSP en las matrices de moluscos es un proceso muy común, pudiendo transformar una única toxina o multitud de ellas. Se han descubierto varias especies de moluscos en las costas portuguesas y británicas, como *Spisula solida* o *Scrobicularia plana*, capaces de sufrir diversas transformaciones, lo que provoca que en caso de haber una contaminación no se pueda asegurar qué toxina PSP puede llegar al consumidor, sin comprobar antes qué rutas metabólicas pueden haber seguido las toxinas en el organismo de los bivalvos (Turner et al., 2013), (Artigas et al., 2007).

En estos mismos trabajos donde estudian la conversión de varias toxinas, se ha encontrado que las GTX<sub>2,3</sub> sufren una conversión espontánea y muy rápida, en la almeja blanca o *Espisula sólida*, a su análogo decarbamoilado, pudiendo observar dcGTX<sub>2,3</sub> en los primeros momentos tras la contaminación, y alcanzando una conversión de hasta el 94% pasadas seis horas a temperatura ambiente (Turner et al., 2013). Por otro lado, también hay evidencia de que la transformación puede ocurrir más lentamente, como ocurre con la almeja de perro o *Scrobicularia plana*, que tiene una actividad carbamoilasa más lenta. Esto se dedujo del hecho de que pasadas 24 y 48 horas, las toxinas decarbamoiladas ocuparon el 5% del perfil tóxico total, mientras que pasados seis días, alcanzaron el 41% (Artigas et al., 2007).

La finalidad de este Trabajo Fin de Grado ha sido estudiar las posibles conversiones de las toxinas GTX<sub>2,3</sub> en algunas de las especies de moluscos más comercializadas en la Comunidad Autónoma Gallega. Se ha trabajado con aquellas especies comercialmente en el momento que se comenzó este trabajo: *Venerupis corrugata* y *Ensis magnus*, o almeja babosa y navaja, respectivamente (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).

Dado que no existen datos en estudios anteriores sobre las posibles conversiones de *Venerupis corrugata* y *Ensis magnus*, el estudio de estos procesos servirá para tener información sobre las toxinas realmente presentes y que por tanto pueden llegar al consumidor, más allá de cuáles

son las toxinas inicialmente encontradas en los moluscos. Esto ayudará a velar correctamente por una adecuada seguridad alimentaria.

## 2 Objetivos

La importancia de la detección y cuantificación de toxinas PSP, y en concreto de GTX2,3 y sus posibles conversiones en matrices de molusco, es fundamental para conocer la toxicidad a la que está expuesto el consumidor. En Galicia se comercializan algunas variedades de molusco de las que se desconoce, hasta el momento, las toxinas reales presentes en su matriz, atendiendo a estos fenómenos de conversión. En base a todo esto, los objetivos de este trabajo son:

- Evaluar el riesgo de intoxicación, en función de sus factores de toxicidad, para las toxinas bajo estudio, en las matrices de almeja babosa (*Venerupis corrugata*) y navaja (*Ensis magnus*).
- Evaluar la aparición de nuevas toxinas en el molusco.
- Comparar la conversión de las toxinas en las dos especies de molusco.

## 3 Material y métodos

### 3.1 Reactivos

El estándar analítico de GTX2  $56,2 \pm 3,8 \mu\text{M}$  y GTX3  $20,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$  proviene de Cifga S.A (Lugo, España). El estándar analítico de dcGTX2  $99,3 \pm 5,5 \mu\text{M}$  y dcGTX3  $22,7 \pm 2,7 \mu\text{M}$  proviene de Cifga S.A (Lugo, España). El estándar analítico de C1  $83,02 \pm \mu\text{M}$  y C2  $23,01 \pm \mu\text{M}$  proviene de Cifga S.A (Lugo, España). El acetonitrilo 99,9% de grado HPLC y el ácido acético glacial 99,8% fueron suministrados por Panreac S.A. (Barcelona, España). El metanol 99,9% de grado HPLC fue provisto por Fisher Scientific S.L. (Madrid, España). El formiato amónico 97% es de Merck (Madrid, España). El peróxido de hidrógeno al 30% (w/w) de Scharlab S.L. (Barcelona, España). El hidróxido de sodio en lentejas se obtuvo de Panreac Química SLU (Barcelona, España).

El agua se purificó mediante un sistema Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA). Los filtros de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  y los filtros de jeringa de nylon con tamaño de poro  $0,45 \mu\text{m}$  fueron adquiridos de Sartorius Biotech GmbH (Gotinga, Alemania). Las jeringas Injekt-F de  $1 \pm 0,05 \text{ mL}$  se obtuvieron de B. Braun Medical AG (Sempach, Suiza). Los cartuchos Supelclean LC-18 SPE de 3 mL, 500 mg fueron proporcionados por SUPELCO (Bellefonte, Pensilvania, Estados Unidos). Los tubos de plástico estériles de 15 y 50 mL fueron adquiridos de Deltalab S.L. (Barcelona, España)

### 3.2 Método de Lawrence

Para la detección y cuantificación de GTX 2,3, dcGTX2,3 y C1,2 se ha utilizado en este Trabajo Fin de Grado una modificación del método de Lawrence. Este método fue validado en 2005 por la AOAC mediante un ensayo colaborativo (Lawrence et al., 2005), y es actualmente el método oficial para determinación de toxinas PSP (B Ben-Gigirey, 2012). Para las toxinas de nuestro estudio realizamos la oxidación con peróxido de hidrógeno y la separación cromatográfica utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD).

El HPLC, de Shimadzu, consta de un controlador (modelo CBM-20A), dos bombas (modelo LC-10AD), desgasificador (modelo DGU-14A), un detector de fluorescencia (modelo RF-

10AXL), un autoinyector con regulador de temperatura (ya que se trabajó con los viales a 6°C) y con capacidad para 70 viales (modelo SIL-20AC) y un horno para columna (modelo CTO-20AC) que permite que la columna trabaje en la temperatura óptima de 35°C. Para la separación cromatográfica se utilizó una precolumna Supelguard LC-18 (Supelco, Merck) con unas dimensiones de 2 cm x 4 mm de diámetro, seguida de una columna cromatográfica Supelcosil LC-18 (Supelco, Merck) de fase inversa con unas dimensiones de 15 cm x 4,6 mm de diámetro, ambas con 5 µm de tamaño de partícula.

Para la elución de las toxinas o sus análogos se ha utilizado un gradiente compuesto por dos fases móviles con las siguientes características:

- Fase A: disolución de formiato amónico 0,1M en agua Milli-Q con pH ajustado a 6 con ácido acético 0,1M.
- Fase B: disolución de formiato amónico 0,1M en agua Milli-Q al 5% de acetonitrilo con pH ajustado a 6 con ácido acético 0,1M.

La descripción del gradiente de elución de las dos fases con respecto al tiempo se ilustra en la Tabla 3 y en la Figura 3. El flujo es de 1 mL/min y el volumen de inyección de 25 µL.

Tabla 3. *Gradiente binario en porcentajes, frente al tiempo.*

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
5	95	5
9	30	70
11	100	0
15	100	0
20	100	0

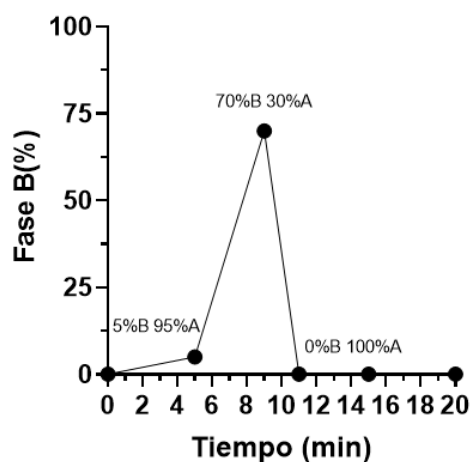


Figura 3. *Gradiente de fases móviles frente al tiempo.*

### 3.2.1 Oxidación de muestras

La oxidación de las toxinas PSP es vital para su detección, ya que, por sí mismas, no son fluorescentes. Pueden ser oxidadas con peryodato o peróxido en función del grupo al que pertenezcan (Anon, 2005). En la Figura 4 se observan los resultados cromatográficos de la oxidación de diferentes toxinas por ambos métodos.

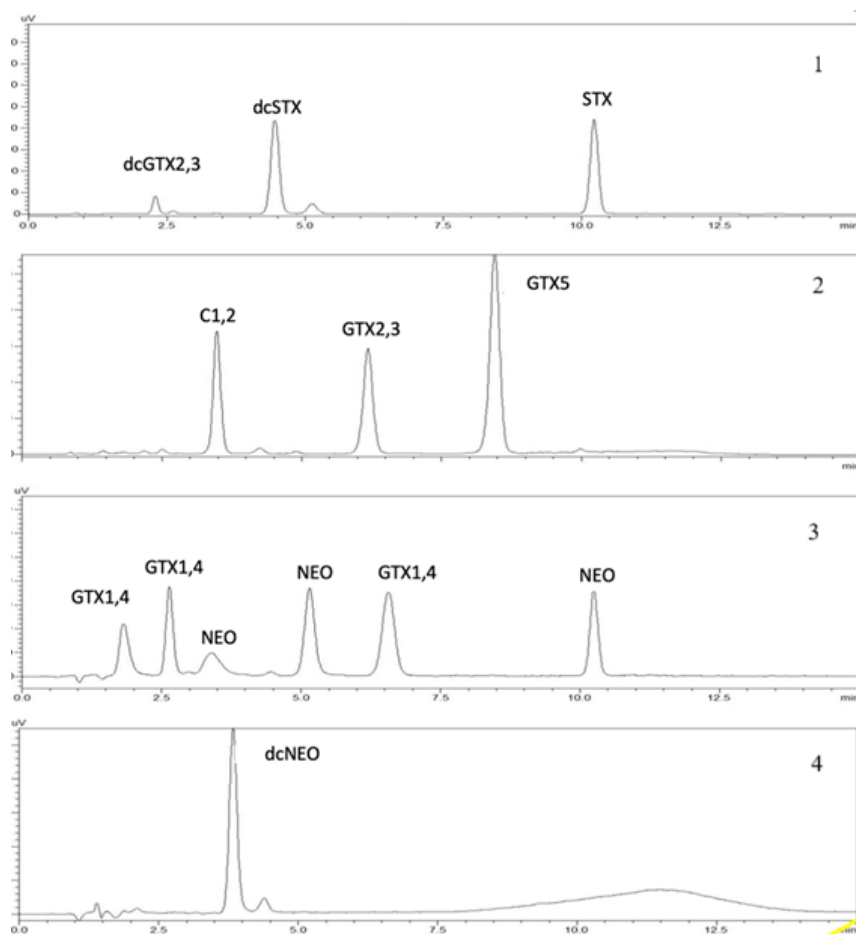


Figura 4. Patrones cromatográficos que muestran los productos de oxidación de la STX y análogos formados tras las oxidaciones con peryodato (cromatogramas 3 y 4) y peróxido (cromatogramas 1 y 2).

En este Trabajo Fin de Grado se trabajó con las toxinas GTX 2,3, en este caso la oxidación con peróxido permite obtener un pico mayor, lo cual mejorará su detección y cuantificación, por lo que es el método de oxidación empleado.

El proceso de oxidación seguido fue el siguiente:

- Se preparó diariamente una disolución de 10 mL de peróxido de hidrógeno al 10% en agua Milli-Q.
- Se añadieron 250  $\mu$ L de NaOH 1M a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Seguidamente se añadieron al tubo Eppendorf 25  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 10%.
- A continuación, se añade a la mezcla 100  $\mu$ L de muestra para oxidar, se mezcla en vórtex y se deja dos minutos a temperatura ambiente.
- A los dos minutos, se añaden 20  $\mu$ L de acético glacial, y se mezcla bien en vórtex para parar la reacción.

### **3.3 Preparación de muestra**

Para la preparación de cada muestra se siguió el procedimiento aceptado por el Laboratorio de Referencia de Biotoxinas Marinas de la Unión Europea (EURLMB) para determinación de PSPs, que establece el método de Lawrence como método oficial para la determinación de estos compuestos. Se llevó a cabo el siguiente protocolo:

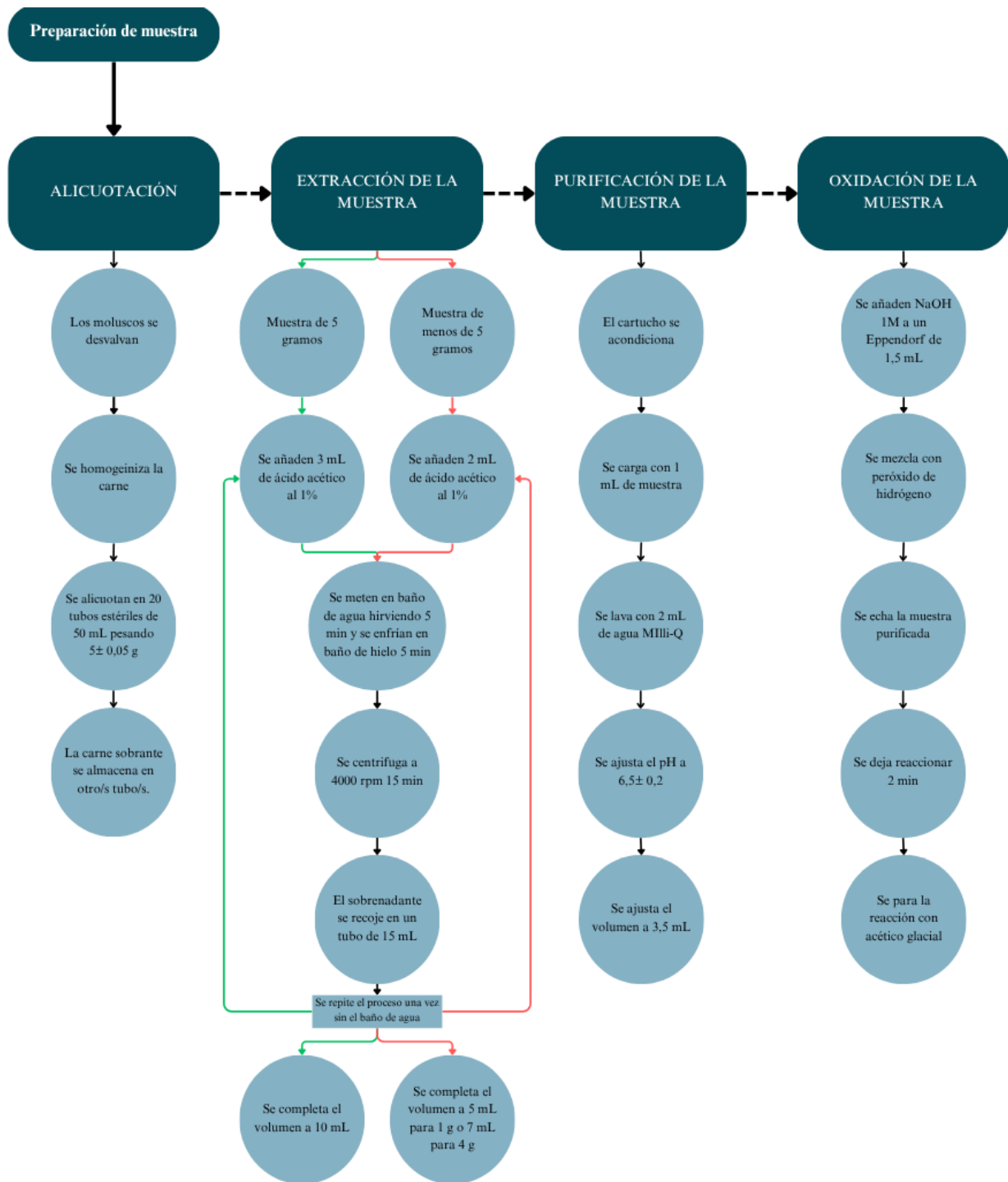


Figura 5. Diagrama general del proceso de preparación de muestra con pasos intermedios.

Almeja babosa (*Venerupis Corrugata*) y navaja (*Ensis Magnus*) se obtuvieron de un mayorista local, se les quitó la cáscara, se homogeneizaron y se les escurrió la mayor cantidad de líquido posible mediante un colador. Se procesó el homogeneizado de cada molusco en 20 alícuotas de  $5,0 \pm 0,05$  g, almacenadas en tubos de plástico estériles de 50 mL.



Figura 6. *Venerupis corrugata*.



Figura 7. *Ensis magnus*.

El homogeneizado de almeja pesó 202,40 g, por lo que además de las 20 alícuotas de 5 g preparadas, se almacenó un excedente de  $40,0 \pm 0,05$  g de almeja que se guardó en un tubo adicional, para posibles procesados posteriores.

El homogeneizado de navaja pesó 479,5 g, por lo que además de las 20 alícuotas se obtuvieron seis tubos con  $40,0 \pm 0,05$  g de navaja cada uno.

### 3.3.1 Extracción de muestras

Se realizaron dos procedimientos de extracción diferentes, modificando los volúmenes de ácido acético en función de la masa de molusco de partida. A continuación, se detallan los pasos para cada extracción:

#### 3.3.1.1 Extracción con 5 g de muestra:

- Añadir 3,0 mL de ácido acético al 1% al tubo de muestra y mezclar en un vórtex 2 minutos.
- Aflojar la tapa del tubo para evitar presiones, y depositar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Después, cerrar la tapa y enfriar el tubo en baño de hielo durante 5 minutos. Tras esto, agitar nuevamente en el vórtex 2 minutos.
- Centrifugar las muestras a 4000 rpm y a 4 °C durante 15 minutos.
- Transferir el sobrenadante obtenido a un tubo de centrifuga de 15 mL, y al tubo con el pellet se le añaden una vez más 3 mL de ácido acético al 1%. Agitar en vórtex 2 minutos.
- Repetir el proceso de extracción, centrifugando pero sin el paso de ebullición.
- Combinar los sobrenadantes obtenidos y completar el volumen final a 10 mL con agua Milli-Q.

#### 3.3.1.2 Extracción con menos de 5 g de muestra:

- Añadir 2,0 mL de ácido acético al 1% al tubo de muestra y mezclar en un vórtex durante 2 minutos.
- Aflojar la tapa del tubo para evitar presiones, y depositar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Después, cerrar la tapa y enfriar el tubo en baño de hielo durante 5 minutos. Tras esto, agitar nuevamente en el vórtex durante 2 minutos.
- Centrifugar las muestras a 4000 rpm y a 4 °C durante 15 minutos.
- Transferir el sobrenadante obtenido a un tubo de centrifuga de 15 mL, y al tubo con el pellet se le añaden una vez más 2 mL de ácido acético al 1%. Agitar en vórtex 2 minutos.
- Repetir el proceso de extracción, centrifugando pero sin el paso de ebullición.
- Combinar los sobrenadantes obtenidos y completar el volumen final a 5 mL (para muestras de 1 g), o a 7 mL (para muestras de 4 g) con agua Milli-Q.

### 3.3.2 Purificación de extractos

La purificación de los extractos es necesaria para limpiar impurezas, eliminar componentes no deseados, y proteger el equipo frente a posible suciedad, evitando así interferencias en los resultados.

Para una purificación válida, el extracto debe pasar a un flujo de entre 1-2 mL por minuto por un cartucho SPE-C18 (3 mL, 500 mg). Se utilizó una bomba de vacío para conseguir el flujo correcto, y tubos graduados estériles de 15 mL para recoger los extractos purificados. Los pasos detallados son los siguientes:

Para acondicionar el cartucho:

- Pasar a través del cartucho 3 mL de metanol dos veces y desechar.
- Pasar a través del cartucho 3 mL de agua Milli-Q dos veces y desechar.

Para purificar el extracto:

- En un tubo distinto al usado para acondicionar, se hace pasar 1 mL de extracto y se recoge.
- Pasar 2 mL de agua Milli-Q para lavar el cartucho y recoger en el mismo tubo que el extracto.

Una vez tengamos el extracto purificado con los cartuchos, se ajusta el pH a  $6,5 \pm 0,2$  utilizando NaOH 0,1M y ácido acético 0,1M. Se ajusta el volumen con agua Milli-Q a 3,5 mL. Como último paso, utilizando una jeringa de 1,5 mL y un filtro de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$ , se filtra el extracto con el pH ajustado. El producto final resultante será oxidado e inyectado en el equipo de HPLC-FLD.

### 3.4 Conversión de toxinas PSP en relación al tiempo

Se contaminó una muestra de  $8,5 \pm 0,05$  g, se agitó durante dos minutos en vórtex y se separó en ocho alícuotas de  $1,0 \pm 0,01$  g. Se realizó la extracción de cada alícuota a un tiempo diferente tras la contaminación, específicamente a 0, 1, 2, 3, 4, 6, 24 y 28 horas tras la contaminación. Después de ser extraídas, se purificaron debidamente, y se oxidaron para su análisis.

Posteriormente fue necesario reevaluar esta etapa de contaminación con GTX2,3 en función de los resultados obtenidos en el apartado 4.3.2, tal como se describirá más adelante.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Intervalo de calibrado

Para construir la recta de calibrado, se realizaron 8 diluciones seriadas desde una disolución madre de volumen 240  $\mu\text{L}$  y concentración 2  $\mu\text{M}$  preparada directamente del estándar comercial de la toxina correspondiente. Con un factor de dilución 1:2, el rango de calibrado es 2  $\mu\text{M}$  - 0,015  $\mu\text{M}$ . En la Tabla 4 se aprecian los detalles de la preparación de las disoluciones patrón.

Tabla 4. Diluciones seriadas de 2  $\mu\text{M}$  - 0,015  $\mu\text{M}$  para GTX 2,3, dcGTX 2,3 y C 1,2.

Patrón	Concentración ( $\mu\text{M}$ ) GTX 2,3 y C 1,2	Concentración ( $\mu\text{M}$ ) dcGTX 2,3	Volumen de H <sub>2</sub> O Milli-Q añadido ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de disolución diluido ( $\mu\text{L}$ )
P1	2,00	2,00	*	*
P2	1,00	1,00	120	120 (de P1)
P3	0,500	0,500	120	120 (de P2)
P4	0,250	0,250	120	120 (de P3)
P5	0,125	0,125	120	120 (de P4)
P6	0,063	**	120	120 (de P5)
P7	0,031	0,031	120	120 (de P6)
P8	0,015	**	120	120 (de P7)

\*Al ser la disolución madre, se prepara directamente de los estándares comerciales. Para preparar una disolución de volumen 240  $\mu\text{L}$  y concentración 2,00  $\mu\text{M}$  de:

GTX 2,3: Se añaden 6,25  $\mu\text{L}$  de patrón a 233,75  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.

C1,2: Se añaden 4,50  $\mu\text{L}$  de patrón a 235,5  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.

dcGTX 2,3: Se añaden 3,90  $\mu\text{L}$  de patrón a 236,1  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.

\*\* En la recta de calibrado de dcGTX 2,3 se prepararon seis disoluciones. La razón de esta diferencia se explicará más adelante en la discusión de resultados.

Con los calibrados de las toxinas principales involucradas en el estudio, se pudo llevar a cabo la identificación y cuantificación en las muestras. El resto de resultados están referidos al cálculo con estas ecuaciones de recta. Para cada recta de calibrado se obtuvieron los siguientes resultados expuestos en la Tabla 5:

Tabla 5. Concentración de patrones utilizada para la realización del calibrado y las áreas de pico correspondientes a cada toxina.

Concentración (μM)	Área de pico GTX2,3	Área de pico dcGTX2,3	Área de pico C1,2
2,00	5787735,7	1643364,2	7022782,9
1,00	3286810	902459,8	3481422,6
0,500	1631834,2	468161,0	1988986,6
0,250	598354,3	159548,2	724008,8
0,125	397302,2	111618,4	502555,0
0,063	121230,4		158075,1
0,031	65895,4	19345,1	86644,9
0,015	20906,7		29386,9

Las ecuaciones obtenidas para las rectas de calibrado, junto con sus coeficientes de correlación, se detallan a continuación:

- **GTX2,3**

Ecuación de la recta:  $y = 2969483,97x + 13296,26$   $R^2 = 0,9943$

- **dcGTX2,3**

Ecuación de la recta:  $y = 834796,19x + 7436,29$   $R^2 = 0,9948$

- **C1,2**

Ecuación de la recta:  $y = 3522106,21x - 813,67$   $R^2 = 0,9979$

Los calibrados fueron usados también para observar los tiempos de retención de las toxinas de interés. En las Figuras 8 y 9 se observan los cromatogramas del análisis de varios estándares de toxinas a bajas concentraciones, junto con sus tiempos de retención.

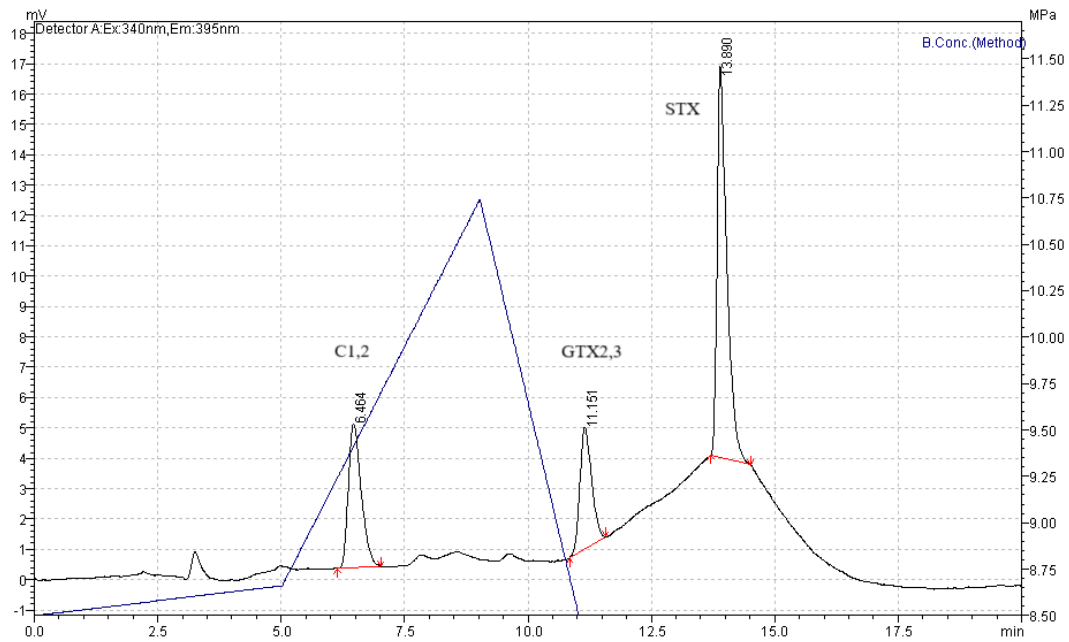


Figura 8. Cromatograma de una disolución de C1,2, GTX2,3 y STX\* de concentración  $0,03 \mu\text{M}$ .

\*La saxitoxina (STX) fue objeto de otro estudio, y por eso aparece en algunos cromatogramas, pero no forma parte del trabajo aquí desarrollado.

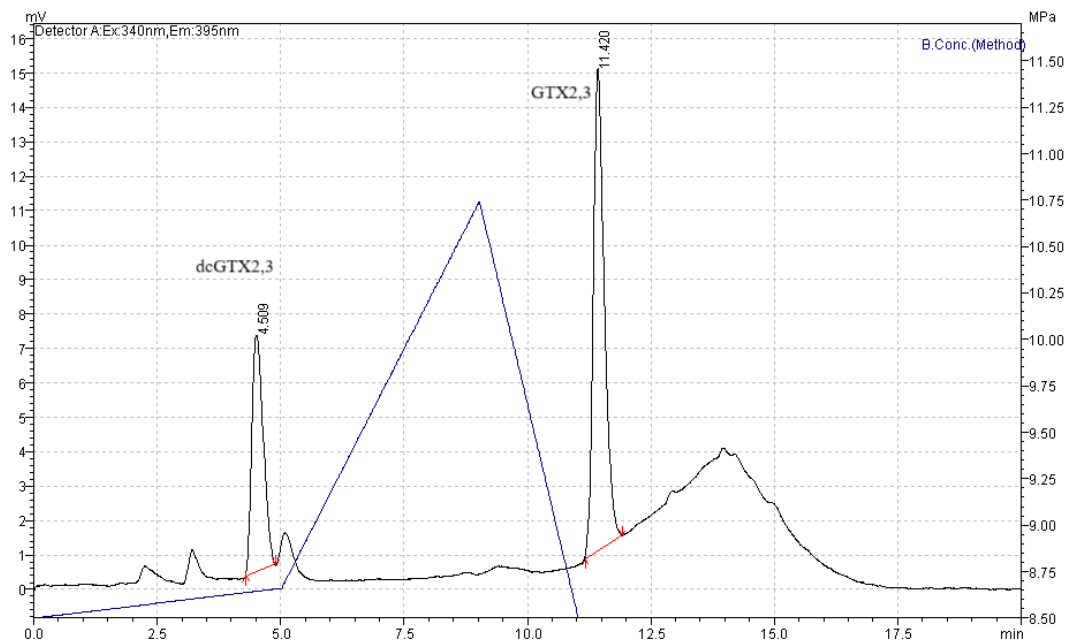


Figura 9. Cromatograma de una disolución de dcGTX2,3 y GTX2,3 de concentración  $0,06 \mu\text{M}$ .

Atendiendo a lo observado en los cromatogramas de las rectas de calibrado, los tiempos de retención a los que aparecerán los picos correspondientes a las toxinas de interés son las indicadas en la tabla 6.

Tabla 6. *Tiempos de retención de GTX2,3, dcGTX2,3 y C1,2*

Toxina PSP	GTX2,3	dcGTX2,3	C1,2
Tiempo de retención (min)	11,1-11,5	4,4-4,6	6,1-6,4

## 4.2 Blancos experimentales.

Se envió un extracto purificado de cada molusco al Laboratorio de Referencia de Biotoxinas Marinas de la Unión Europea (EURLMB) en Vigo, para confirmar que las muestras estaban libres de toxinas PSP. Se realizó una oxidación con peryodato y otra con peróxido para cada muestra, a fin de establecer la posible presencia de cualquier toxina de las que pueden ser analizadas mediante el método de Lawrence. Las Figuras 10-13 muestran los resultados del análisis.

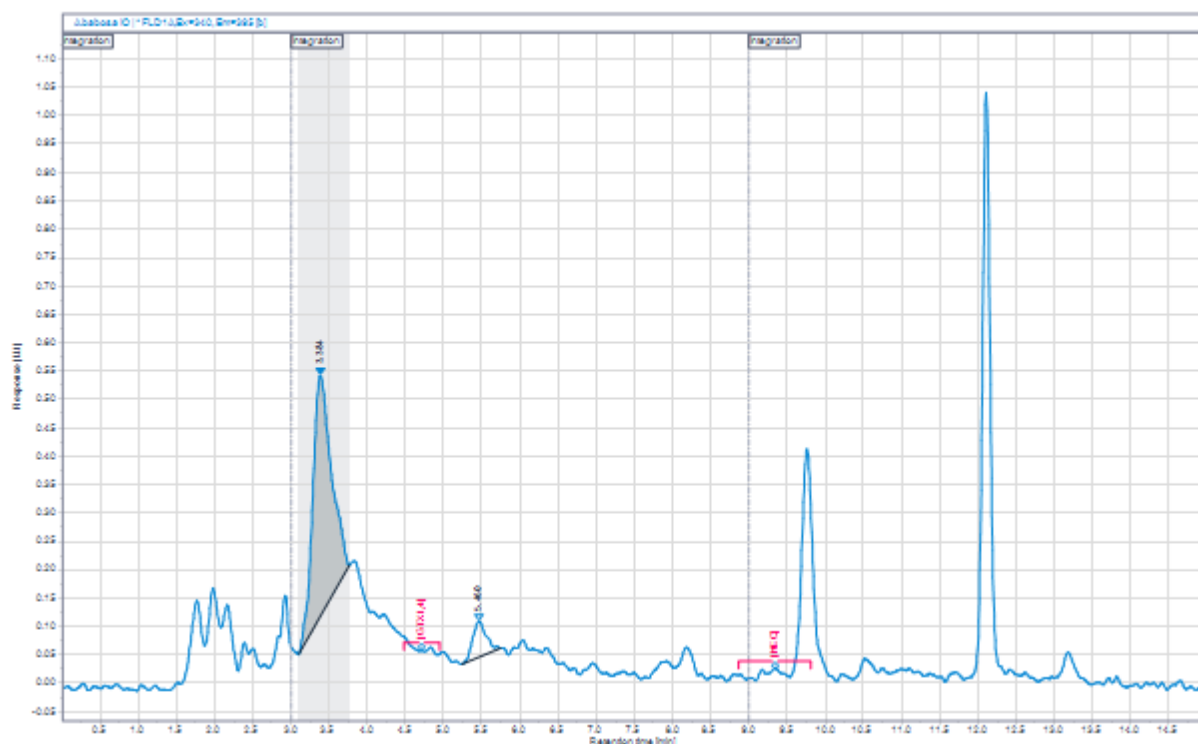


Figura 10. *Cromatograma de la oxidación con peryodato de almeja babosa (Venerupis corrugata).*

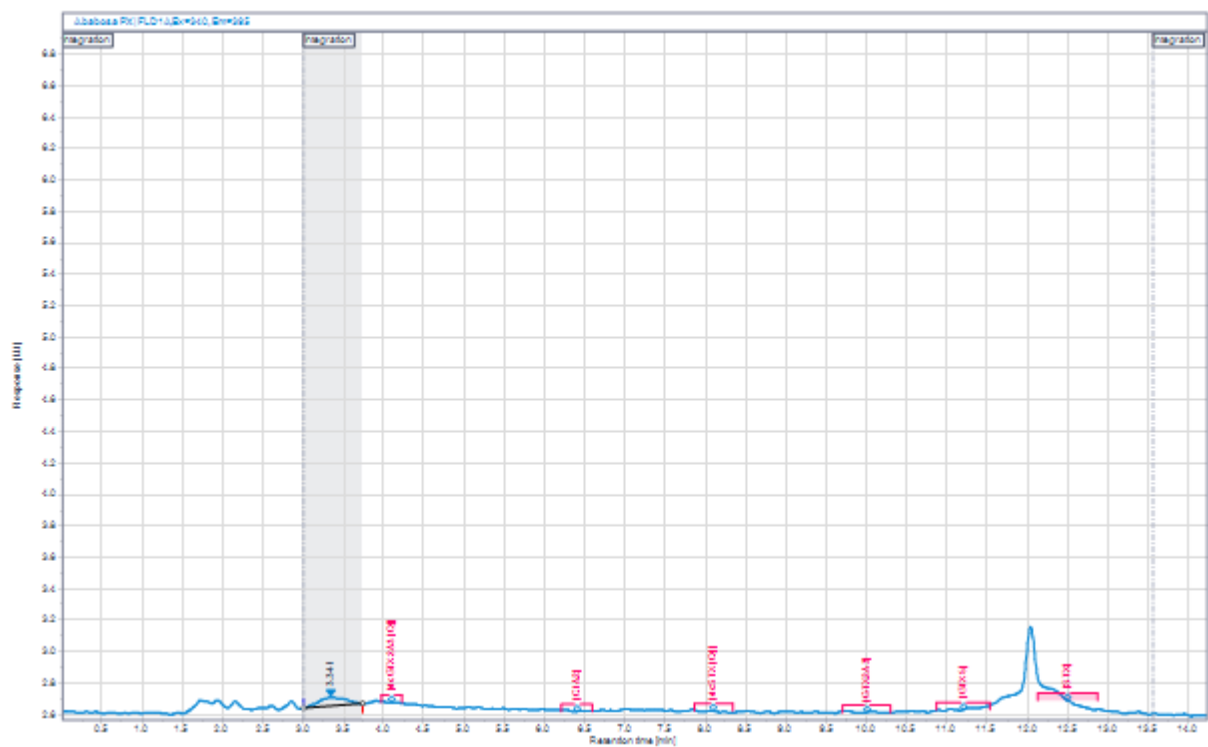


Figura 11. Cromatograma de la oxidación con peróxido de almeja babosa (*Venerupis corrugata*).

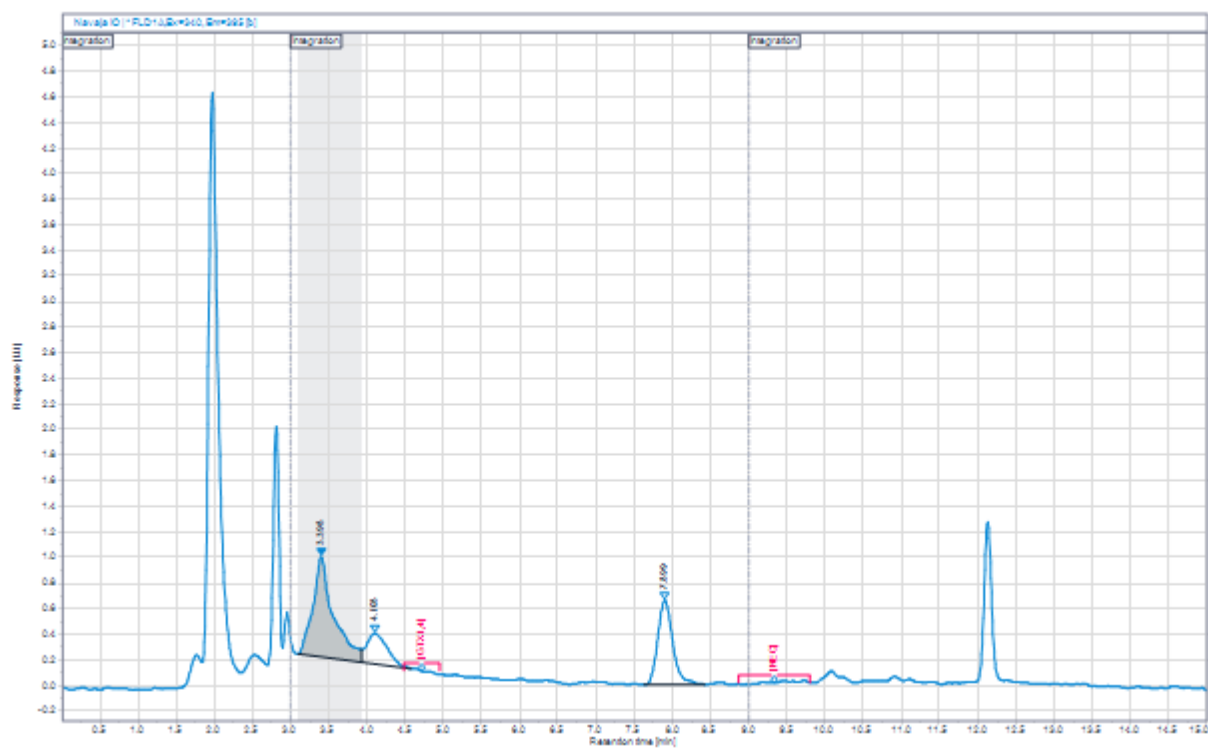


Figura 12. Cromatograma de la oxidación con peryodato de navaja (*Ensis magnus*).

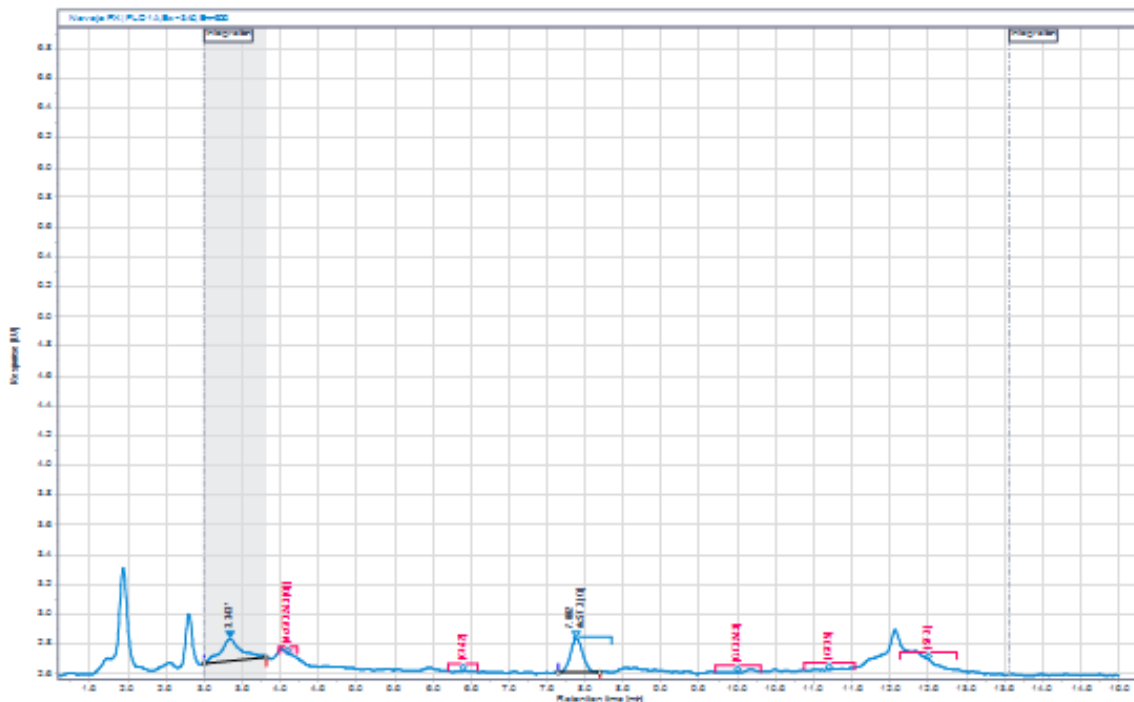


Figura 13. Cromatograma de la oxidación con peróxido de navaja (*Ensis magnus*).

Se confirmó con el análisis que las muestras no presentaban rastro alguno de toxinas PSP. En los cromatogramas se puede observar que tanto para la almeja babosa como para la navaja, en la oxidación con peryodato aparecen unos picos que se deben a compuestos naturalmente fluorescentes, porque no coinciden con el tiempo de elución de ninguna toxina PSP. Por ello, en nuestro propio laboratorio se inyectaron los blancos tras oxidación con peróxido, para así observar si la matriz presentaba algún compuesto fluorescente que pudiera interferir en las mediciones de las toxinas de interés.

La Figura 14 corresponde a la lectura de una inyección de agua Milli-Q. Sirve como referencia de un cromatograma en el que no se detecta ningún compuesto fluorescente, ya que cuando aparece algún pico en una inyección de agua Milli-Q es síntoma de suciedad o contaminación. Se observa en el cromatograma un pico muy amplio a un tiempo de retención de alrededor de 14 minutos, que es debido al gradiente de elución empleado. Su tamaño es constante, pero se verá más grande en los cromatogramas en los que no aparezca ningún pico cromatográfico, como ocurre al analizar agua Milli-Q. Por el contrario, a medida que eluyan toxinas u otros compuestos fluorescentes, se verá de un tamaño más reducido debido al autoescalado de las gráficas.

Las Figuras 15 y 16 corresponden a los cromatogramas de blancos de almeja babosa y navaja, respectivamente. Se observan picos en ambos cromatogramas, demostrando que ambos moluscos presentan compuestos fluorescentes en la matriz. Estos compuestos podrían generar interferencias en los resultados si las toxinas eluyeran a su mismo tiempo de retención. GTX2,3 y C1,2 eluyen a tiempos en los que no hay interferencias, pero dcGTX2,3 comparte su tiempo

de elución con pico presente en el blanco de navaja. En caso de observar deGTX2,3 se debe tener en cuenta este pico inherente a la matriz.

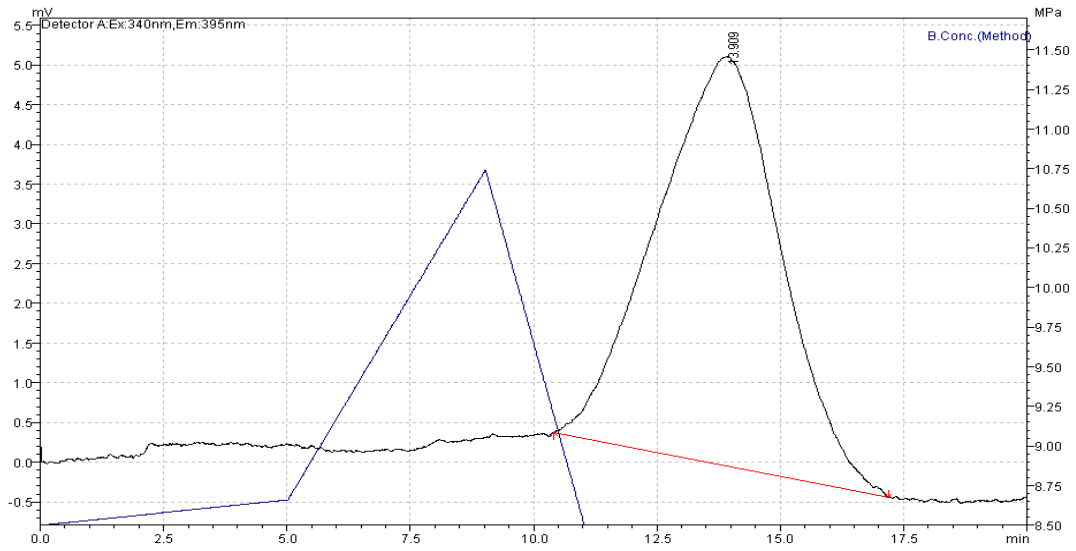


Figura 14. Cromatograma de una muestra de agua.

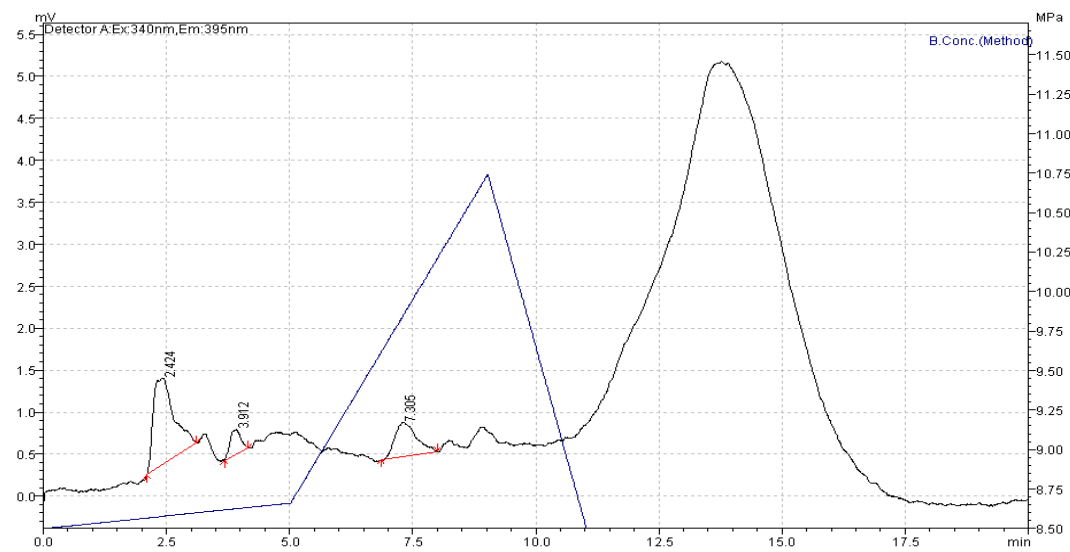


Figura 15. Cromatograma de un blanco de almeja babosa.

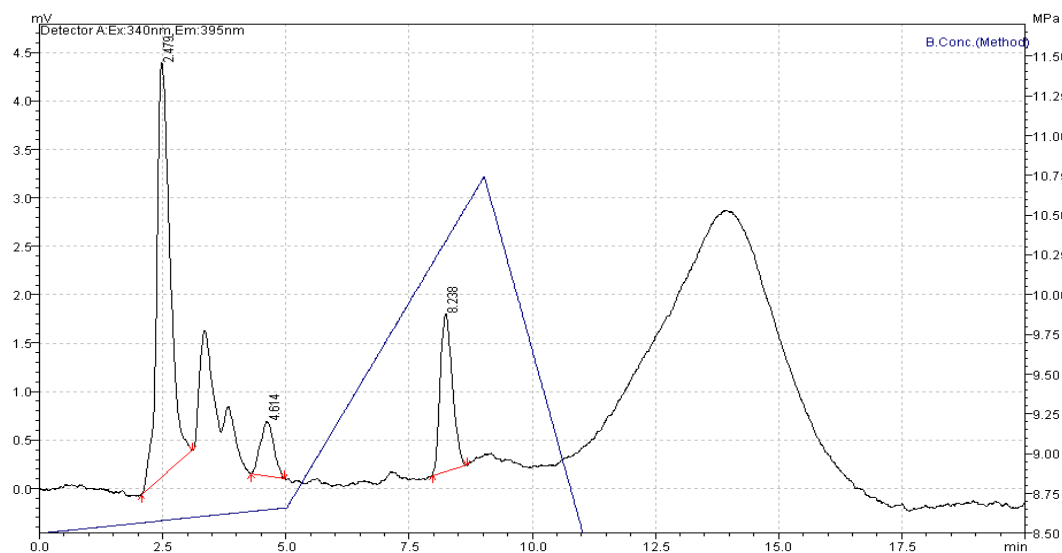


Figura 16. Cromatograma de un blanco de navaja.

### 4.3 Estudio de la conversión de GTX2,3 en almeja babosa

#### 4.3.1 Prueba de detección y cuantificación

Se hizo una primera contaminación de  $5 \pm 0,05$  g de almeja para comprobar que tras la preparación de la muestra aparece un pico de GTX2,3 o de un producto de conversión. Se siguió el siguiente procedimiento:

A  $5 \pm 0,05$  g de muestra se añadieron  $175 \mu\text{L}$  de un patrón de GTX2,3 de concentración  $19,6 \mu\text{M}$ . El procedimiento se hizo por duplicado. Después de la contaminación, se extrajeron, purificaron, oxidaron y analizaron. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 17.

Se puede observar claramente un pico correspondiente a GTX2,3, lo suficientemente grande como para ser cuantificado. En la Tabla 7 se expresan la concentración en la muestra analizada y la concentración real teniendo en cuenta la dilución que se produce durante el procesado de la muestra.

La dilución depende del procedimiento realizado. En este caso, el volumen final en la extracción fue de 10 mL (factor de dilución 10), y 1 mL de extracto se diluyó a 3,5 mL en la purificación (factor de dilución 3,5). Por lo tanto, el factor de dilución en este experimento fue de 35.

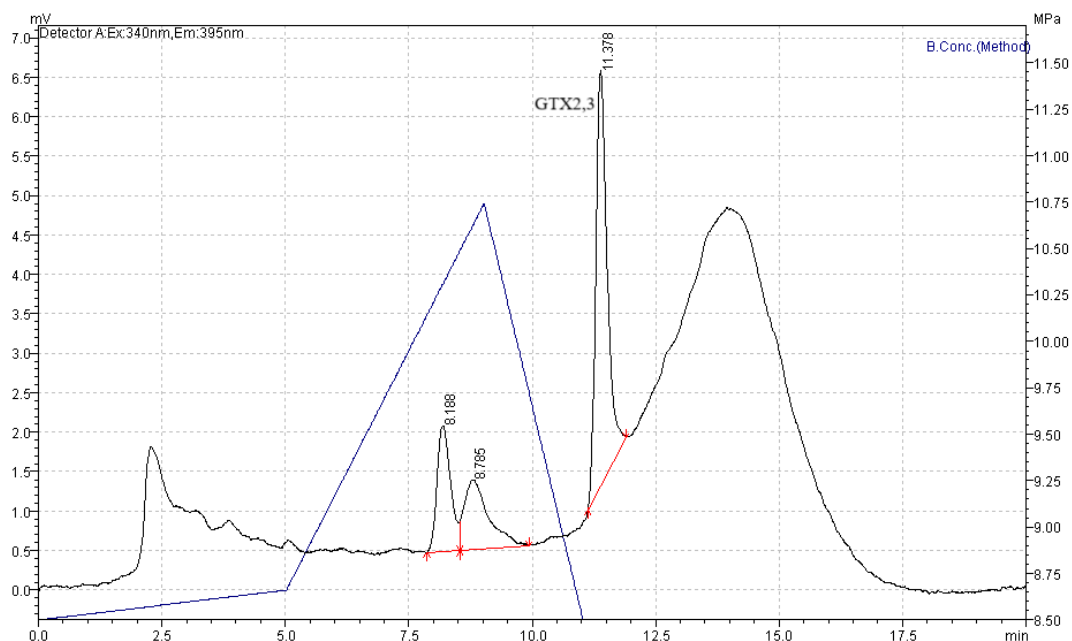


Figura 17. Cromatograma de una muestra de 5 g de almeja babosa contaminada con GTX2,3.

Tabla 7. Resultados referidos al pico de GTX2,3 de la Figura 17.

Área de pico	Concentración GTX2,3 en la muestra analizada ( $\mu\text{M}$ ).	Concentración GTX2,3 en la muestra original ( $\mu\text{M}$ )
85027,5	0,024	0,84

#### 4.3.2 Conversión de toxinas PSP en relación al tiempo

Se analizaron ocho alícuotas de  $1 \pm 0,01$  g extraídas a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 6, 24 y 28 horas tras la contaminación), por duplicado y preparadas a partir de una muestra de  $8,5 \pm 0,05$  g. Se realizaron dos experimentos con el mismo procedimiento, pero tomando un volumen diferente de toxina para alcanzar dos niveles de contaminación diferentes. El procedimiento fue el siguiente:

En el primer experimento, a  $8,5 \pm 0,05$  g de muestra se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de patrón comercial de GTX2,3 de concentración 76,8  $\mu\text{M}$ . Se agitó en vórtex tres minutos y se alicuotaron ocho muestras de  $1,0 \pm 0,01$  g. El procedimiento se realizó por duplicado. Cada alícuota se procesó a un tiempo distinto tras la contaminación, y se analizó tras la debida oxidación.

En el segundo experimento, se contaminaron  $9 \pm 0,05$  g para hacer más sencilla la alicuotación de 8 muestras de  $1,0 \pm 0,01$  g. A esos  $9 \pm 0,05$  g de muestra se añadieron 120  $\mu\text{L}$  de patrón comercial de GTX2,3 de concentración 76,8  $\mu\text{M}$ . Se agitó en vórtex tres minutos y se alicuotaron ocho muestras de  $1,0 \pm 0,01$  g. El procedimiento se realizó por duplicado. Cada

alícuota se procesó a un tiempo distinto tras la contaminación, y se analizó tras la debida oxidación.

En los cromatogramas del primer experimento se aprecia un pico de GTX2,3 no cuantificable, como se observa en la Figura 18. Esto es debido a que la cantidad con la que se contaminó no fue suficiente, ya que aunque teóricamente sí se debería haber obtenido un pico cuantificable, en la práctica se observó que el nivel de recuperación de GTX2,3 fue insuficiente. *Turner et al.* (Turner et al., 2013) obtuvieron una tasa de recuperación del 64%, valor que se tendrá en cuenta para contaminar las muestras en experimentos posteriores.

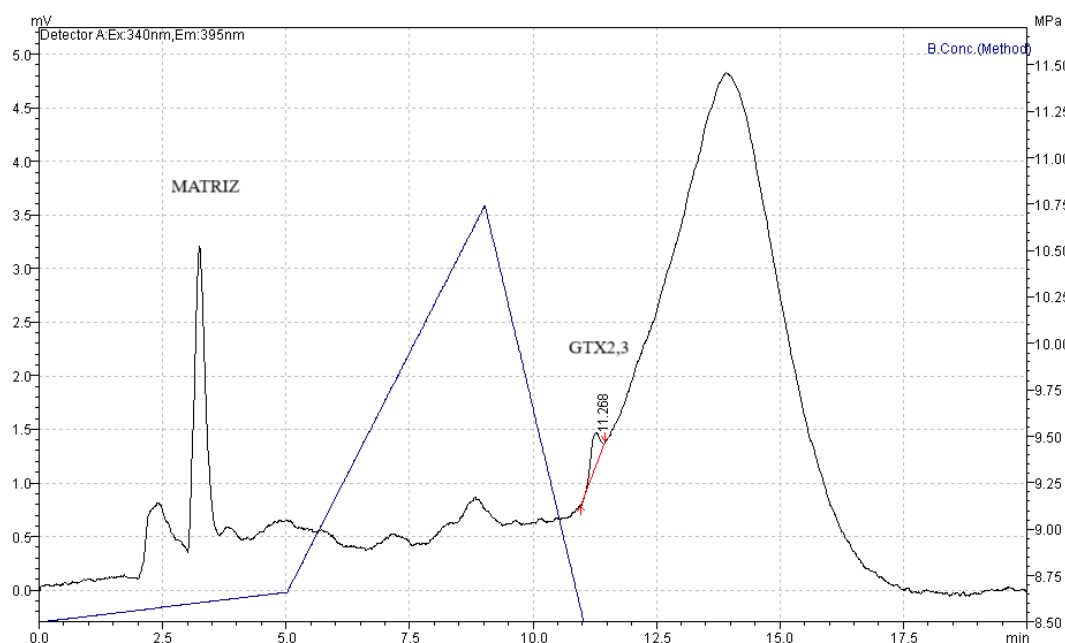


Figura 18. Cromatograma de alícuota de almeja extraída a las 0 horas contaminada con GTX2,3.

En las Figuras 19 y 20 se presentan cromatogramas representativos de la segunda contaminación, realizada con mayor cantidad de toxina. Se aprecia un pico cuantificable de GTX2,3, aunque a los tiempos de retención de las otras toxinas potencialmente presentes en caso de conversión de GTX2,3 no se observa ningún pico. Se encontró disparidad entre réplicas, con presencia de interferencias, picos extraños y variables. Comparando los cromatogramas de diferentes horas, se observa que la concentración de GTX2,3 ni sigue una variación lineal en el tiempo ni permanece constante, lo que sugiere la existencia de inconsistencias en el método de contaminación o procesado de muestra.

En la Tabla 8 se muestran los resultados numéricos de los picos cuantificables, en este caso el factor de dilución es: el volumen final del extracto es de 5 mL (factor de dilución de 5) y como en la purificación el factor de dilución es de 3,5, el factor de dilución total del procesado de estas muestras es 17,5.

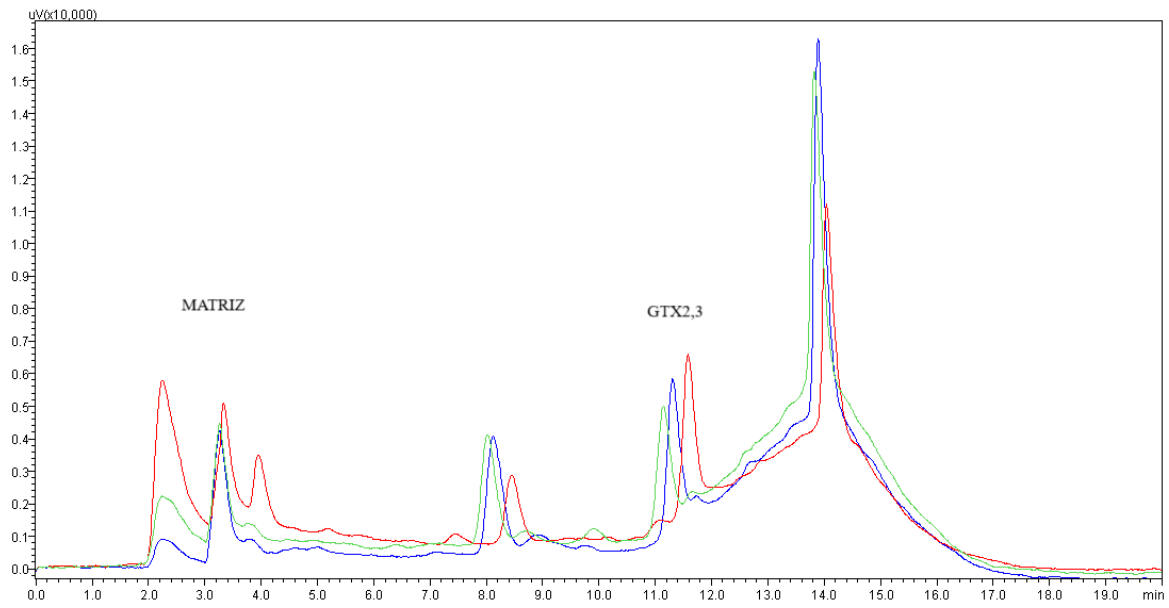


Figura 19. Cromatograma de la réplica 1 de las alícuotas de almeja extraídas a las 0 horas (rojo), 1 horas (verde) y 6 horas (azul).

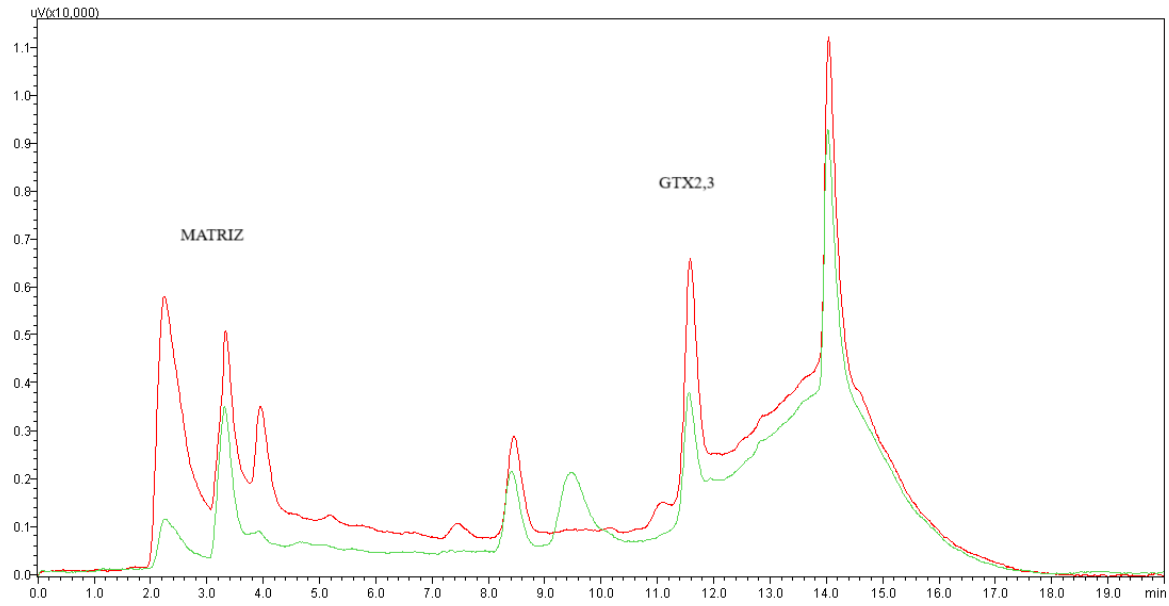


Figura 20. Cromatograma de las réplicas 1 (rojo) y 2 (verde) de una alícuota de almeja extraída a las 0 horas tras ser contaminadas con GTX2,3.

Tabla 8. Resultados de la contaminación GTX2,3 en diferentes horas.

Tiempo (horas)	Área de pico	Concentración GTX2,3 en la muestra analizada (µM).	Concentración GTX2,3 en la muestra original (µM)
0	69350,5	0,019	0,330
1	64252,9	0,015	0,300
2	34804,4	0,007*	0,127*
3	34926,9	0,007*	0,127*
4	73282,7	0,020	0,354
6	55815,5	0,014*	0,251*
24	41454,8	0,009*	0,166*
28	35300,0	0,007*	0,130*

\*Valores estimativos por encontrarse por debajo del primer punto del intervalo de calibrado.

En este punto, los resultados obtenidos indican que, aún contaminando las muestras de almeja con una concentración elevada de GTX2,3, no hay indicios de transformación de GTX2,3 en otras toxinas. Esto puede ser debido a que *Venerupis corrugata* tiene una muy baja actividad enzimática de enzimas transformadoras de GTX2,3 (como carbamoilasas o sulfotransferasas), o que simplemente carece de ellas.

Al no encontrar evidencias de conversión, en el resto de la experimentación se redujo el número de tiempos tomados dado que apenas se observaron diferencias en los cromatogramas en los intervalos de tiempos inferiores a 6 horas.

Además, en estos análisis la repetibilidad y reproducibilidad no fue satisfactoria, siendo común la presencia de picos anómalos, con mala resolución o colas largas. Estas interferencias indicaban que el método de contaminación y el procesado de muestras realizado por otros autores como *Turner et al.* (Turner et al., 2013) no funcionaron como se esperaba.

Por estas razones, se decidió cambiar el proceso de contaminación, o dopaje, de las muestras: primeramente, se prepararon las alícuotas con la masa de molusco deseada, y, después, se contaminaron por separado con la cantidad de toxina correspondiente, en lugar de contaminar una muestra única para después alicuotarla.

#### 4.3.3 Contaminación post-alicuotación

Se analizaron 3 alícuotas de  $1,0 \pm 0,01$  g extraídas a diferentes tiempos (0, 6 y 24 horas tras la contaminación), cada una de ellas por duplicado. Se contaminaron con 30 µL del estándar comercial de GTX2,3 con una concentración de 76,8 µM. Se aumentó la concentración por si la conversión era mínima y no superaba el límite de detección.

A diferencia de los resultados descritos en el apartado anterior, no se encontraron interferencias en los cromatogramas, y la resolución de los picos y línea base mejoró notablemente. La Figura 21 muestra que la repetibilidad mejoró apreciablemente, dando lugar a cromatogramas muy parecidos, con una ligera excepción en el tiempo de 24 horas, al ser las dos réplicas ligeramente diferentes entre sí.

La Figura 22 demuestra que al comparar los picos de GTX2,3 a diferentes tiempos, la concentración de toxina permanece estable, como se expone numéricamente en la Tabla 9, y no se detectan picos relacionados con otras toxinas.

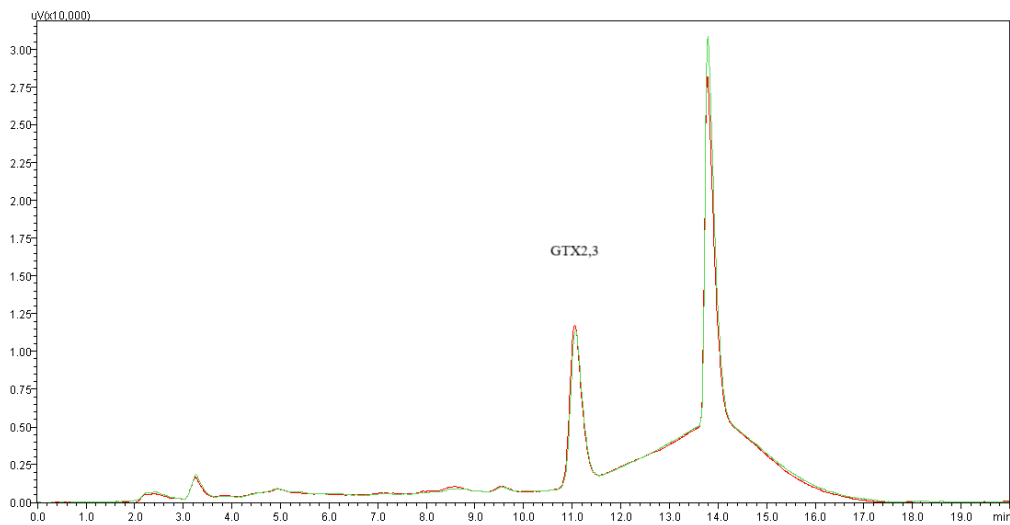


Figura 21. Cromatograma de las réplicas 1 (rojo) y 2 (verde) de las alícuotas de almeja extraídas a 0 horas tras ser contaminadas post-alícuotación con GTX2,3.

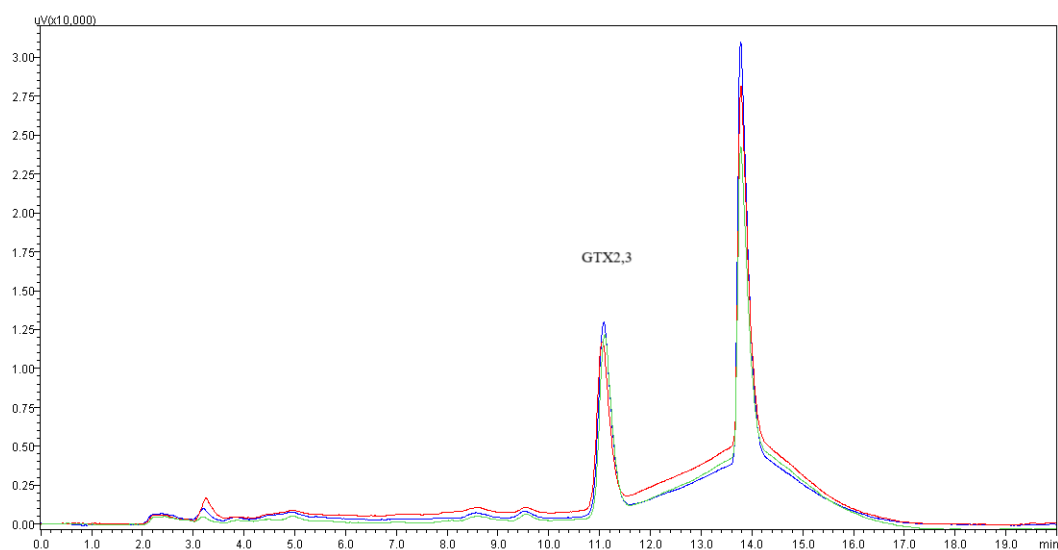


Figura 22. Comparativa de los cromatogramas de alícuotas de almeja contaminadas post-alícuotación a 0 horas (rojo), 6 horas (azul) y 24 horas (verde) tras la contaminación con GTX2,3.

Tabla 9. Áreas de pico y concentraciones de GTX2,3 en las muestras contaminadas post-*aliquotación* a tiempo 0, 6 y 24 horas.

Tiempo (horas)	Área de pico	Concentración GTX2,3 en la muestra analizada (µM).	Concentración GTX2,3 en la muestra original (µM)
0	174903,3	0,054	0,952
6	222813,2	0,071	1,235
24	193519,3	0,061	1,062

#### 4.3.4 Estabilidad de GTX2,3 en la matriz

Se prepararon 3 alícuotas de  $1,0 \pm 0,01$  g, por duplicado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.3. Se realizó la extracción a 30, 48 y 72 horas tras la contaminación.

Se observó una disminución de la concentración de GTX2,3 pasadas las 30 horas, sin encontrar otros picos que pudieran indicar la presencia de nuevas toxinas. Las réplicas fueron muy similares entre ellas, sin encontrar picos interferentes u otro tipo de contaminación en ningún cromatograma. La Figura 23 muestra una comparación de los cromatogramas resultantes del análisis realizado mientras que en la Tabla 10 se presentan los resultados numéricos.

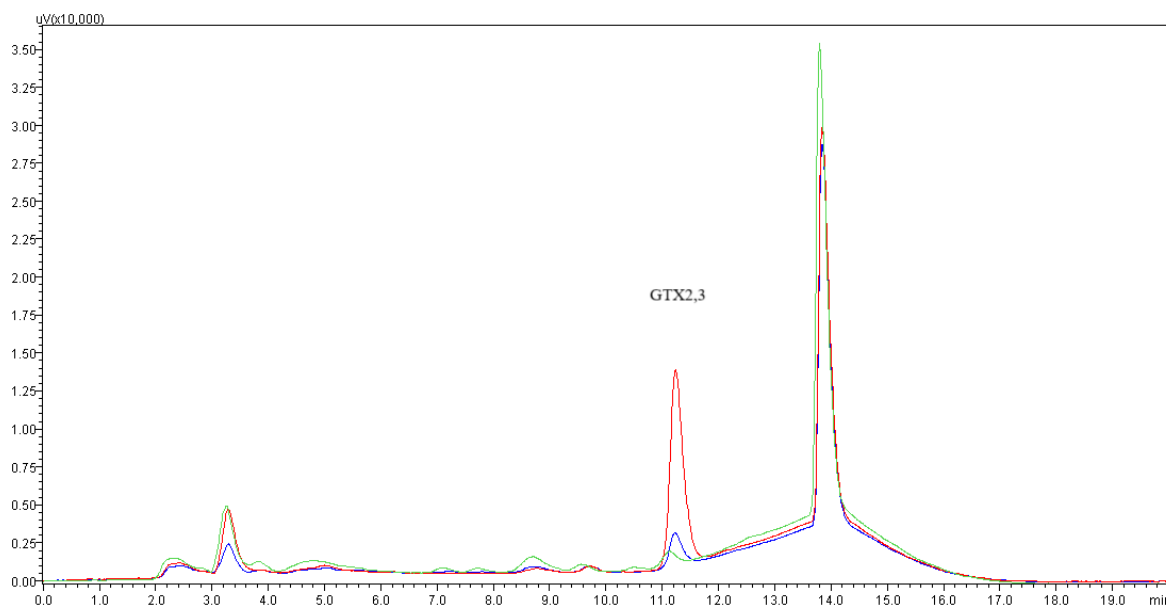


Figura 23. Comparación de los cromatogramas de alícuotas de almeja contaminadas post-*aliquotación* a 30 horas (rojo), 48 horas (azul) y 72 horas (verde) tras la contaminación con GTX2,3.

Tabla 10. Áreas de pico y concentraciones de GTX2,3 en las muestras contaminadas post-alicuotación a tiempo 30, 48 y 72 horas.

Tiempo (horas)	Área de pico	Concentración GTX2,3 en la muestra analizada (µM).	Concentración GTX2,3 en la muestra original (µM)
30	247294,3	0,079	1,379
48	41283,5	0,009*	0,165*
72	29428,1	0,005*	0,095*

\* Valores estimativos por encontrarse por debajo del primer punto del intervalo de calibrado.

Los resultados obtenidos permitieron comprobar el rango de tiempo óptimo para llevar a cabo los experimentos, ya que se han descrito casos en los que los moluscos transforman las toxinas PSP pasadas 24 horas (Artigas et al., 2007). En el margen de tiempo de 30 a 48 se produjo una degradación de aproximadamente el 90% de GTX2,3, lo que permitió concluir que para tiempos mayores de 30 horas no se puede estudiar la conversión de esta toxina.

A la vista de todos los resultados encontrados para *Venerupis corrugata* se concluye que no existe conversión de GTX2,3 en su toxina decarbamoilada dcGTX2,3, ni en ninguna otra toxina, tras haber probado el procesado con una alícuota de muestra total, que luego se volvía a alicuotar para añadir la toxina y ver qué ocurría con su posible conversión.

Se comprobó que contaminando las alícuotas ya preparadas se obtuvieron resultados mucho más reproducibles y con mejor resolución, a pesar de que el procedimiento seguido por otros autores no fue este sino que fue el inicialmente seguido el apartado 4.3.2. Parece que cuanto mayor es la cantidad de muestra que se contamina, más complejo es el proceso de homogeneización, provocando que al alicuotar se preparen muestras de igual masa pero diferente concentración de toxina. Esto explicaría el por qué inicialmente, al contaminar una masa mayor (por ejemplo 8,5 g en el apartado 4.3.2) los cromatogramas obtenidos fueron menos reproducibles.

## 4.4 Estudio de la conversión de GTX2,3 en navaja

### 4.4.1 Conversión de toxinas PSP en relación al tiempo

Se prepararon 3 alícuotas de  $1,0 \pm 0,01$  g por duplicado. Se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 4.3.3: se añadieron 30 µL de patrón comercial de GTX2,3 de concentración 76,8 µM. Se extrajeron debidamente, purificaron, oxidaron y analizaron. Los tiempos a la que se realizó la extracción fueron 0, 6 y 24 horas, en vista de los resultados obtenidos con la almeja babosa.

No aparecieron en ningún cromatograma picos anómalos, o interferencias asociadas a contaminación. La buena resolución de las réplicas y la estabilidad de los cromatogramas facilitaron el que los dos picos que se observaron se tratasen como picos de toxinas. El pico de GTX2,3 se identificó con sencillez al ser usual su presencia en los cromatogramas de este estudio, pero la identidad de la toxina que provocaba el otro pico fue inicialmente una incógnita, ya que su tiempo de elución era más tardío que el de dcGTX2,3, la toxina potencialmente presente de acuerdo a lo encontrado en la bibliografía (Leal & Cristiano, 2022) en caso de existir la conversión de GTX2,3.

Por la proximidad del tiempo de elución a la dcGTX2,3 se decidió analizar un patrón de C1,2. Tras corroborar que el patrón de C1,2 compartía el mismo tiempo de elución que el pico desconocido, se confirmó que era esta toxina la que estaba presente en la muestra, y que era por tanto un producto de la conversión de GTX2,3 en la matriz de navaja.

Los cromatogramas de 0 y 6 horas resultaron ser muy similares. Se observó un pico de GTX2,3 y un pico de C1,2 muy parecidos en tamaño. En el cromatograma de 24 horas se observa que el pico de C1,2 aumenta su tamaño, mientras que el de GTX2,3 disminuye, confirmando así la relación entre los dos picos. En la Figura 24 se hace una comparación de un cromatograma de cada tiempo en el que se aprecia el aumento del pico de C1,2 y la disminución del pico de GTX2,3. En la Tabla 11 se resumen los resultados numéricamente.

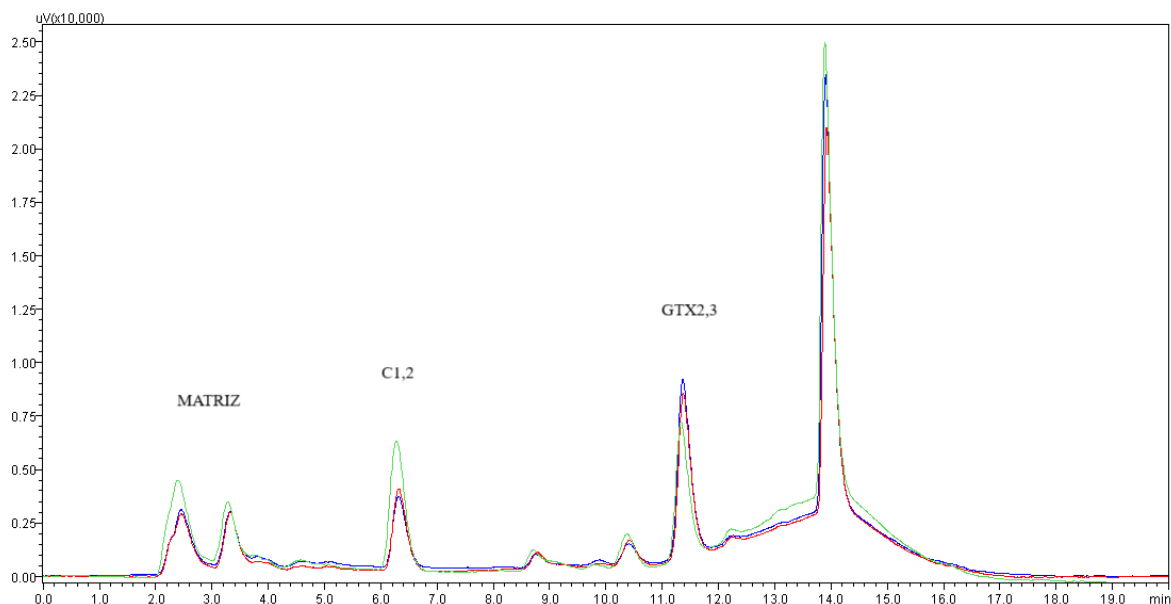


Figura 24. Comparación de los cromatogramas a 0 horas (azul), 6 horas (rojo) y 24 horas (verde) tras la contaminación de las alicuotas de navaja con GTX2,3.

Tabla 11. Áreas de pico y concentraciones de GTX2,3 y C1,2 en las muestras de navaja contaminadas post-alicuotación a tiempo 0, 6 y 24 horas.

Tiempo (horas)	0	6	24
Área de pico GTX2,3	138839,6	128062,6	78307,0
Concentración GTX2,3 en la muestra analizada ( $\mu\text{M}$ )	0,042	0,039	0,022
Concentración GTX2,3 en la muestra original ( $\mu\text{M}$ )	0,740	0,676	0,383
Área de pico C1,2	64297,7	64087,7	101427,0
Concentración C1,2 en la muestra analizada ( $\mu\text{M}$ )	0,018	0,018	0,029
Concentración C1,2 en la muestra original ( $\mu\text{M}$ )	0,324	0,322	0,508
Porcentaje de conversión (%)	30,45	32,26	57,01

#### 4.4.2 Dependencia del porcentaje de conversión con la masa

Para comprobar la relación entre el porcentaje de toxina convertida y la masa de molusco tomada, se probó con otra masa superior: se prepararon 3 alícuotas de  $4,0 \pm 0,05$  g por duplicado. Se contaminaron con 40  $\mu\text{L}$  de patrón comercial de GTX2,3 con una concentración de 76,8  $\mu\text{M}$ . Se realizó la extracción a 0, 12 y 24 horas tras la contaminación. La razón de tomar estos tiempos tuvo como origen los valores tomados en el apartado anterior, en donde no se observaron diferencias apreciables hasta las 6 horas, por lo que se decidió investigar que ocurría en tiempos intermedios entre 6 y 24 horas.

Como se puede observar en la Figura 25, en el cromatograma de 0 horas los picos correspondientes a GTX2,3 y a C1,2 son más grandes que en las otras horas. Comparando los otros dos cromatogramas, se observa una disminución con el tiempo del pico de GTX2,3, y un aumento del pico de C1,2. De acuerdo a lo observado experimentalmente y descrito en los apartados 4.3.2 y 4.3.3 existe una relación entre la falta de reproducibilidad y la cantidad de toxina añadida. Esto podría ser la razón de que en este caso para 0 horas los picos de las toxinas sean mayores. Sin embargo, para poder concluir estos argumentos con mayor certeza, es necesario llevar a cabo más análisis. En la Tabla 12 se resumen los resultados numéricos.

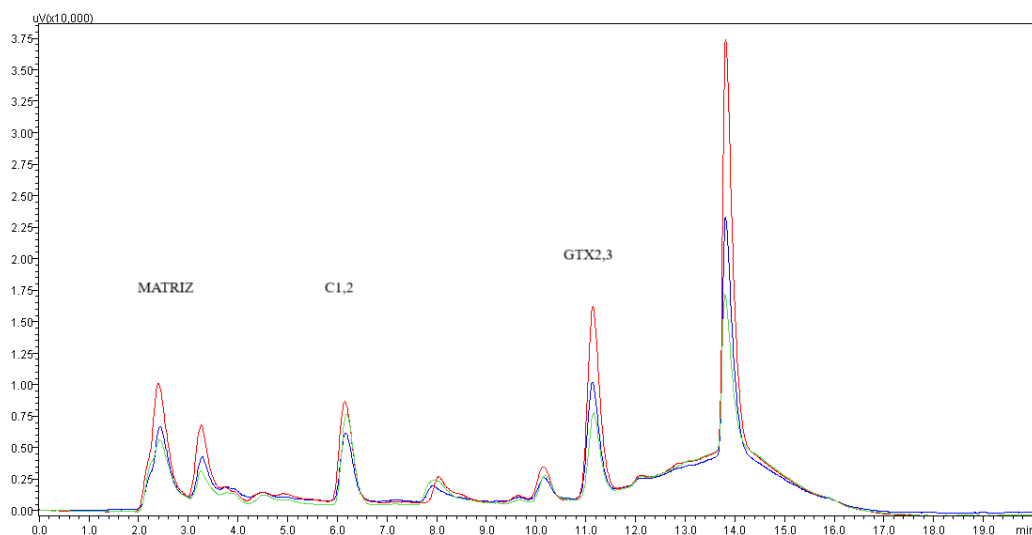


Figura 25. Comparación de los cromatogramas de alícuotas contaminadas con GTX2,3 post-aliuotación a 0 horas (rojo), 12 horas (azul) y 24 horas (verde).

Tabla 12. Áreas de pico y concentraciones de GTX2,3 y C1,2 en las muestras de navaja de 4 g contaminadas post-aliuotación a tiempo 0, 12 y 24 horas.

Tiempo (horas)	0	12	24
Área de pico GTX2,3	251363,9	144775,3	119081,8
Concentración GTX2,3 en la muestra analizada ( $\mu\text{M}$ )	0,080	0,044	0,036
Concentración GTX2,3 en la muestra original ( $\mu\text{M}$ )	1,964	1,085	0,873
Área de pico C1,2	141123,8	92458,4	104928,6
Concentración C1,2 en la muestra analizada ( $\mu\text{M}$ )	0,040	0,026	0,030
Concentración C1,2 en la muestra original ( $\mu\text{M}$ )	0,987	0,649	0,736
Porcentaje de conversión (%)	33,45	37,43	45,74

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para *Ensis magnus* se puede concluir que se produce una transformación de GTX2,3 en C1,2. Hay evidencias de que algunas especies de moluscos, como el mejillón *Mytilus edulis*, o la ostra *Crassostrea gigas*, realizan la conversión de C1,2 en GTX2,3, pero no hay constancia de alguna especie de molusco que realice la conversión de GTX2,3 en C1,2. De hecho, esta conversión fue teorizada como posible en

cultivos de *Alexandrium tamarense*, ya que en este dinoflagelado se encontraron sulfotransferasas específicas que llevan a cabo esta transformación (Wang et al., 2007).

Atendiendo a los porcentajes de conversión, los resultados obtenidos indican una conversión más rápida en el momento inicial de la contaminación cuando se toma una mayor cantidad de masa de molusco. Sin embargo, parece que el porcentaje de conversión se iguala en horas intermedias, superando la masa de 1 g a la de 4 g en el tiempo final de 24 horas. En la Tabla 13 se observa la comparación de los porcentajes de conversión obtenidos para 1 y 4 g.

Tabla 13. Comparación de los porcentajes de conversión a diferentes tiempos para muestras de 1 y 4 gramos.

Tiempos (horas)	0	6	12	24
Porcentaje de conversión de muestra de 1 g (%)	30,45	32,26	-	57,01
Porcentaje de conversión de muestra de 4 g (%)	33,45	-	37,43	45,74

Aún así, y a la vista de los resultados obtenidos, estableciendo una comparación entre los valores para almeja babosa y navaja, parece evidente que hay una relación entre la masa de molusco contaminada y la cantidad de toxina añadida, en relación a la reproducibilidad de los resultados. Dado que en el caso de la navaja sí es evidente la conversión de GTX2,3 en C1,2 y en almeja babosa dicha conversión no ocurre, queda para estudios posteriores el establecer cómo influye la masa de molusco tomada en la reproducibilidad de los resultados. Por otra parte, este aspecto tiene una influencia definitiva en los análisis llevados a cabo por los laboratorios oficiales de análisis de biotoxinas marinas. En estos laboratorios, el protocolo de análisis indica que se deben recoger entre 100-150 g de vianda: si influye la masa que se toma es evidente que habrá también influencia en la conversión de toxina en estudio.

Por todo lo anterior, queda evidenciada la conversión de GTX2,3 en C1,2 en la matriz de *Ensis magnus*, lo que tiene una influencia directa en la toxicidad, atendiendo a los TEFs (Tabla 2).

La toxicidad de GTX2,3 es superior a la de C1,2, y por consiguiente y en función del tiempo de procesado del molusco, desde su captura hasta su consumo, el riesgo de intoxicación disminuirá al tener lugar esta conversión, hecho que no ocurre en la almeja babosa.

## 5 Conclusiones

1. No se ha encontrado conversión de GTX2,3 en *Venerupis corrugata*, a diferencia de lo que otros autores han encontrado para otras especies de almejas.
2. El procedimiento de contaminación de la muestra de molusco influye en la reproducibilidad de los resultados obtenidos.
3. Se ha encontrado una mejor reproducibilidad cuando la muestra se contamina para cada alícuota con la que posteriormente se trabaja, en lugar de hacer una única contaminación, y a continuación tomar alícuotas.
4. En *Ensis magnus* existe conversión de GTX2,3 a C1,2 resultado encontrado por primera vez en una especie de molusco.
5. La cantidad de muestra de molusco influye en la reproducibilidad de los resultados de la conversión: a mayor cantidad de muestra, más reproducibles los resultados.
6. La mayor conversión de GTX2,3 en C1,2 ocurre transcurridas 24 horas.

## 6 Bibliografía

- Alfonso, A., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2016). Yessotoxin, a promising therapeutic tool. *Marine drugs*, 14(2), 30. <https://doi.org/10.3390/md14020030>
- Alonso, E., Alfonso, A., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2016). Evaluation of toxicity equivalent factors of paralytic shellfish poisoning toxins in seven human sodium channels types by an automated high throughput electrophysiology system. *Archives of toxicology*, 90, 479-488. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1444-y>
- Amzil, Z., Derrien, A., Terre Terrillon, A., Duval, A., Connes, C., Marco-Miralles, F., . . . Mertens, K. N. (2021). Monitoring the emergence of algal toxins in shellfish: First report on detection of brevetoxins in French Mediterranean mussels. *Marine drugs*, 19(7), 393. <https://doi.org/10.3390/md19070393>
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., & Hallegraeff, G. M. (2012). Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual review of marine science*, 4(1), 143-176. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081121>
- Andrinolo, D. o., Michea, L. F., & Lagos, N. (1999). Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon*, 37(3), 447-464. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00173-1)
- Anon, A. (2005). Official method 2005.06 quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *AOAC International: Gaithersburg, MD, USA*.
- Arnich, N., Abadie, E., Delcourt, N., Fessard, V., Fremy, J.-M., Hort, V., . . . Peyrat, M.-B. (2020). Health risk assessment related to pinnatoxins in French shellfish. *Toxicon*, 180, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.007>
- Artigas, M. L., Vale, P. J. V., Gomes, S. S., Botelho, M. J., Rodrigues, S. M., & Amorim, A. (2007). Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity. *Journal of Chromatography A*, 1160(1-2), 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.008>
- Asakawa, M., Miyazawa, K., Takayama, H., & Noguchi, T. (1995). Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison (PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon*, 33(5), 691-697. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00177-A](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00177-A)
- Authority, E. (2009). Marine biotoxins in shellfish—Saxitoxin group. *EFSA J*, 7(4), 1019. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1019>
- Authority, E. F. S. (2009). Marine biotoxins in shellfish—Summary on regulated marine biotoxins. *EFSA Journal*, 7(8), 1306. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1306>
- Bates, H. A., Kostriken, R., & Rapoport, H. (1978). A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(1), 252-254. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf60215a060>

- Beasley, V., Carmichael, W., Haschek, W. M., Colegrove, K. M., & Solter, P. (2023). Phycotoxins. In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (pp. 305-391). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16153-7.00005-8>
- Ben-Gigirey, B., Rodríguez-Velasco, M., Otero, A., Vieites, J., & Cabado, A. (2012). A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish. *Toxicon*, *60*(5), 864-873. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.022>
- Ben-Gigirey, B., Rodríguez-Velasco, M. L., & Gago-Martínez, A. (2012). Extension of the validation of AOAC official method SM 2005.06 for dc-GTX2, 3: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, *95*(1), 111-121. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-446>
- Besbes, N., Monser, L., Nabli, B. A., & Sadok, S. (2024). Determination of hydrophilic marine biotoxins in bivalve molluscs by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Food Composition and Analysis*, *130*, 106169. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106169>
- Blanco, J., Morono, A., Fernández, M.L. (2005) Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. *Revista Galega de Recursos Mariños (Monog.):1*, 1-70 pp. ©Xunta de Galicia 2005. ISSN: 1885-6802
- Botana, A., & López, V. R. (2015). Chemistry and analysis of PSP toxins. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, 69-84. <https://doi.org/10.1002/9781118500354.ch4>
- Botana, L., Hess, P., Munday, R., Arnich, N., DeGrasse, S., Feeley, M., ... Karunasagar, I. (2016). Toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs. Joint FAO/WHO Technical Paper, 2016. Rome, Italy: FAO/WHO.
- Botana, L. M. (Ed.). (2014). *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Crc Press. <https://doi.org/10.1201/b16662>
- Bricelj, V. M. (1996). Comparative physiological and behavioral responses to PSP toxins in two bivalves molluscs, the softshell clam, *Mya arenaria*, and surfclam, *Spisula solidissima*. *Harmful and toxic algal blooms.*, 405-408.
- Bricelj, V. M., & Shumway, S. E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in fisheries Science*, *6*(4), 315-383. <https://doi.org/10.1080/10641269891314294>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *402*, 231-247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Cembella, A. D. (2003). Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, *42*(4), 420-447. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-420.1>
- Chain, E. P. o. C. i. t. F. (2010a). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish—Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). *EFSA Journal*, *8*(6), 1628. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1628>
- Chain, E. P. o. C. i. t. F. (2010b). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish—Emerging toxins: Brevetoxin group. *EFSA Journal*, *8*(7), 1677. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1677>

- Dell'Aversano, C., Hess, P., & Quilliam, M. A. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A*, *1081*(2), 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.056>
- Dell'Aversano, C., Walter, J. A., Burton, I. W., Stirling, D. J., Fattorusso, E., & Quilliam, M. A. (2008). Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels. *Journal of natural products*, *71*(9), 1518-1523. <https://doi.org/10.1021/np800066r>
- Gaithersburg, M. (2006). USA, Method 2005.06: Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. *Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (First Action 2005)*, 83-96.
- Gessner, B. D., Bell, P., Doucette, G. J., Moczydlowski, E., Poli, M. A., Van Dolah, F., & Hall, S. (1997). Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon*, *35*(5), 711-722. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00154-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00154-7)
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., . . . Netter, Y. B. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, *28*(2), 365-368. [10.1016/S0896-6273\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00116-1)
- Hallegraeff, G. M. (2003). Harmful algal blooms: a global overview. *Manual on harmful marine microalgae*, *33*, 1-22.
- Halstead, B. W. (1965). *Poisonous and venomous marine animals of the world: invertebrates*. US Government Printing Office.
- Hess, P., Grune, B., Anderson, D. B., Aune, T., Botana, L. M., Caricato, P., . . . Lawrence, J. F. (2006). Three Rs Approaches in Marine Biotxin Testing: The report and recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO workshop (ECVAM Workshop 55). *Alternatives to Laboratory Animals*, *34*(2), 193-224. <https://doi.org/10.1177/02611929060340020>
- Hines, H. B., Naseem, S. M., & Wannemacher Jr, R. W. (1993). [3H]-saxitoxinol metabolism and elimination in the rat. *Toxicon*, *31*(7), 905-908. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90226-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90226-9)
- Konoki, K., Baden, D. G., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2019). Molecular determinants of brevetoxin binding to voltage-gated sodium channels. *Toxins*, *11*(9), 513. <https://doi.org/10.3390/toxins11090513>
- Kotaki, Y. (1989). Screening of bacteria which convert gonyautoxin 2, 3 to saxitoxin. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, *55*(7). <https://doi.org/10.2331/suisan.55.1293>
- Krock, B., Seguel, C. G., & Cembella, A. D. (2007). Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae*, *6*(5), 734-744. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.02.005>
- Lagos, N. W., & Andrinolo, D. (2000). Paralytic shellfish poisoning (PSP): toxicology and kinetics. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 203-216.

- 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. *Journal of AOAC International*, 88(6), 1714-1732. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.6.1714>
- Leal, J. F., & Cristiano, M. L. (2022). Marine paralytic shellfish toxins: chemical properties, mode of action, newer analogues, and structure–toxicity relationship. *Natural Product Reports*, 39(1), 33-57. [10.1039/D1NP00009H](https://doi.org/10.1039/D1NP00009H)
- Lehane, L. (2001). Paralytic shellfish poisoning: a potential public health problem. *Medical journal of Australia*, 175(1), 29-31. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2001.tb143508.x>
- Rey López, V. (2017). *Mejora e innovación en los procedimientos de detección y cuantificación de los métodos de análisis de toxinas PSP* (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).
- Luckas, B., & Botana Luis, M. (2000). Chemical analysis of PSP toxins. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 173-186.
- McFarren, E. F. (1959). Report on collaborative studies of the bioassay for paralytic shellfish poison. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 42(2), 263-271. <https://doi.org/10.1093/jaoac/42.2.263>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019, 15 de junio). Resolución de 24 de mayo de 2019, de la Secretaría General de Pesca, por la que se publica el listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España. Boletín Oficial del Estado, núm. 143, pp. 62 708–62 789. <https://www.boe.es/boe/dias/2019/06/15/pdfs/BOE-A-2019-9026.pdf>
- Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Burton, I., ... & Willis, R. (2003). Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology*, 16(8), 1029-1033. <https://doi.org/10.1021/tx034037j>
- Ortiz, A., Navarro, J. M., Pizarro, G., Villanueva, P. A., & Segura, C. J. (2019). Accumulation and biotransformation dynamics of the neurotoxic complex, saxitoxin, in different life stages of *Ostrea chilensis*. *Marine Environmental Research*, 144, 240-245. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.01.014>
- Oshima, Y. (1995). Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. *Harmful marine algal blooms*.
- Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC International*, 78(2), 528-532. <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.2.528>
- Otero, A., Chapela, M. J., Atanassova, M., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2011). Cyclic imines: Chemistry and mechanism of action: A review. *Chemical Research in Toxicology*, 24(11), 1817-1829. <https://doi.org/10.1021/tx200182m>
- Otero, P., & Silva, M. (2022). Emerging marine biotoxins in European waters: Potential risks and analytical challenges. *Marine Drugs*, 20(3), 199. <https://doi.org/10.3390/md20030199>
- Perez, S., Vale, C., Botana, A. M., Alonso, E., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2011). Determination of toxicity equivalent factors for paralytic shellfish toxins by

electrophysiological measurements in cultured neurons. *Chemical research in toxicology*, 24(7), 1153-1157. <https://doi.org/10.1021/tx200173d>

Perl, T. M., Bédard, L., Kosatsky, T., Hockin, J. C., Todd, E. C., & Remis, R. S. (1990). An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine*, 322(25), 1775-1780. <https://doi.org/10.1056/NEJM199006213222504>

Pulido, O. M. (2008). Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine Drugs*, 6(2), 180-219. <https://doi.org/10.3390/md6020180>

Qiu, J., Rafuse, C., Lewis, N. I., Li, A., Meng, F., Beach, D. G., & McCarron, P. (2018). Screening of cyclic imine and paralytic shellfish toxins in isolates of the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) from Atlantic Canada. *Harmful Algae*, 77, 108-118. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.05.005>

Quod, J., & Turquet, J. (1996). Ciguatera in Reunion Island (SW Indian Ocean): epidemiology and clinical patterns. *Toxicon*, 34(7), 779-785. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00164-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00164-6)

RaLonde, R. (1996). Paralytic shellfish poisoning: the Alaska problem. *Alaska's Marine Resources*, 8(2), 1-7.

Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., . . . Blanco, J. (2014). Dinophysins toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine drugs*, 12(1), 394-461. <https://doi.org/10.3390/md12010394>

Rey, V., Botana, A. M., Otero, P., & Botana, L. M. (2023). Improved chemical hydrolysis conditions for the high conversion of the paralytic shellfish toxins GC4 and GC5 into their decarbamoyl analogues dcGTX1 and dcGTX4. *Food Chemistry Advances*, 2, 100289. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100289>

Sarkar, S. K. (2018). *Marine algal bloom: Characteristics, causes and climate change impacts* (Vol. 4). Singapore: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8261-0>

Satin, J., Kyle, J. W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L. L., Fozzard, H. A., & Rogart, R. B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*, 256(5060), 1202-1205. [10.1126/science.256.5060.1202](https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1202)

Schantz, E. J. (1975). Poisonous red tide organisms. *Environmental letters*, 9(3), 225-237. <https://doi.org/10.1080/00139307509435851>

Sommer, H., & Meyer, K. (1937). Paralytic Shell-Fish Poisoning.

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

Thottumkara, A. P., Parsons, W. H., & Du Bois, J. (2014). Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(23), 5760-5784. <https://doi.org/10.1002/anie.201308235>

Turner, A. D., Lewis, A. M., Bradley, K., & Maskrey, B. H. (2021). Marine invertebrate interactions with harmful algal blooms—implications for one health. *Journal of invertebrate pathology*, 186, 107555. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107555>

- Turner, A. D., Lewis, A. M., O'Neil, A., & Hatfield, R. G. (2013). Transformation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK surf clams (*Spisula solida*) for targeted production of reference materials. *Toxicon*, 65, 41-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.008>
- Turner, A. D., Norton, D. M., Hatfield, R. G., Morris, S., Reese, A. R., Algoet, M., & Lees, D. N. (2009). Refinement and extension of AOAC method 2005.06 to include additional toxins in mussels: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 92(1), 190-207. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.190>
- Twiner, M. J., Hess, P., Dechraoui, M.-Y. B., McMahon, T., Samons, M. S., Satake, M., . . . Doucette, G. J. (2005). Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon*, 45(7), 891-900. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.015>
- Vale, C., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Romarís, X. M., Arevalo, F., Botana, A. M., & Botana, L. M. (2008). In vitro and in vivo evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin potency and the influence of the pH of extraction. *Analytical Chemistry*, 80(5), 1770-1776. <https://doi.org/10.1021/ac7022266>
- Vale, P. (2014). Saxitoxin and analogs: ecobiology, origin, chemistry, and detection. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, 991-1011. <https://doi.org/10.1201/b16662>
- Van De Riet, J., Gibbs, R. S., Muggah, P. M., Rourke, W. A., MacNeil, J. D., & Quilliam, M. A. (2011). Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 94(4), 1154-1176. <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.4.1154>
- Van Dolah, F. M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental health perspectives*, 108(suppl 1), 133-141. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s1133>
- Vilarino, N., Rodríguez, I., Alfonso, A., Alfonso, C., Antelo, A., Louzao, M. C., ... & Botana, A. M. (2018). *Environmental toxicology*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG. <https://doi.org/10.1515/9783110442045>
- Wang, D.-Z. (2008). Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Marine drugs*, 6(2), 349-371. <https://doi.org/10.3390/md6020349>
- Wang, D., Zhang, S., & Hong, H. (2007). A sulfotransferase specific to N-21 of gonyautoxin 2/3 from crude enzyme extraction of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* CI01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 25(2), 227-234. <https://doi.org/10.1007/s00343-007-0227-1>
- Watkins, S. M., Reich, A., Fleming, L. E., & Hammond, R. (2008). Neurotoxic shellfish poisoning. *Marine drugs*, 6(3), 431-455. DOI: <https://doi.org/10.3390/md6030431>
- Watson, S. B., Miller, C., Arhonditsis, G., Boyer, G. L., Carmichael, W., Charlton, M. N., . . . Ludsin, S. A. (2016). The re-eutrophication of Lake Erie: Harmful algal blooms and hypoxia. *Harmful Algae*, 56, 44-66. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.010>
- Wiese, M., D'Agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine drugs*, 8(7), 2185-2211. <https://doi.org/10.3390/md8072185>