

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



SISTEMA ANALÍTICO DE UN DISPOSITIVO SENSOR DE TOXINA
AMNÉSICA DE MAREA ROJA

T E S I S

QUE PARA CUBRIR
LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

DAVID HIRAM RAMOS RODRÍGUEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. MAYO DEL 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

SISTEMA ANALÍTICO DE UN DISPOSITIVO SENSOR
DE TOXINA AMNÉSICA DE MAREA ROJA

T E S I S

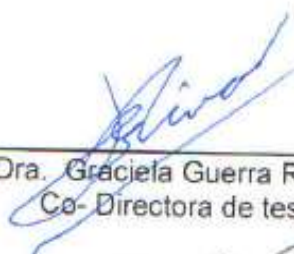
PARA OBTENER TITULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

DAVID HIRAM RAMOS RODRIGUEZ

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas
Co-Directora de tesis



Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Co-Directora de tesis



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal



Dr. David Cervantes Vasquez
Sinodal

Para mi madre, mi padre
y mi hermano, que por siempre
han sido y serán la base de los
logros en mi vida.....

Todos los consejos que los padres
dan a la juventud tienen por finalidad
impedir que sean jóvenes.

Francis de Croisset

RESUMEN de la tesis de David Hiram Ramos Rodríguez, presenta como requisito para la obtención del grado de BIOINGENIERO. Ensenada, Baja California, México. Mayo del 2014.

SISTEMA ANALÍTICO DE UN DISPOSITIVO SENSOR DE TOXINA AMNÉSICA DE MAREA ROJA

Una de las principales toxinas producidas durante los eventos de marea roja causados por los florecimientos algales nocivos (FAN) es el ácido domoico (AD). Conocida también como “toxina amnésica de la marea roja” el efecto que ocasiona se conoce como envenenamiento amnésico por moluscos (ASP). Dada la necesidad de que los productores puedan de lograr una cuantificación oportuna de los niveles de ácido domoico se desarrollo un prototipo de sensor bioquímico basado en la acción de un agente revelador y una separación de cromatografía en capa fina. Distintas fases estacionarias de Silica Gel 60 y μ Celulosa fueron probadas en distintos soportes mecánicos para encontrar la mayor reproducibilidad, facilidad de manejo y resolución en la separación del AD y el ácido kaínico, el cual es otro compuesto altamente toxico perteneciente al igual que el AD a la familia de los cainoides. Para lograr la separación se probaron 4 sistemas principales como fase móvil utilizando tanto placas cromatográficas construidas con la solución Si60-2 como placas comerciales. Se encontró que el sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3) permite obtener valores de R_f de 0.4584 para el AD y 0.3587 para el ácido kaínico, los cuales permiten la separación del analito de otros aminoácidos y una resolución en la separación del AD y el ácido kaínico de 0.926 ± 0.130 ($n = 5$) para las placas con Si60-2 y un valor de 1.48 ± 0.108 ($n = 5$) para las placas comerciales. Para la calibración del sensor se utilizaron estándares de AD en concentraciones de 0, 50, 100, 400 y 800 ppm cargando 1.5 μ l con un tiempo de desarrollo de 15 minutos. La respuesta del sensor se compor to de manera lineal, el voltaje digital incrementa conforme aumenta la cantidad de AD en la muestra ($r^2 = 0.988$). Se experimento con concentraciones menores de 50 ppm y extractos de *Mytilus edulis* cargados con concentraciones conocidas de AD, produciendo resultados variables en ambos casos dada la alta sensibilidad del sistema a la temperatura bajo dichas condiciones de baja concentración y complejidad en la muestra cargada. Con los datos recabados, se discute la posible implementación del sensor bioquímico para la cuantificación in vivo de los niveles de ácido domoico en *Mytilus edulis*.

Palabras clave: FAN, ASP, Ácido domoico, Cromatografía en capa fina.

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres María Guadalupe y Marco Antonio por brindarme su amor, comprensión y apoyo incondicional. Ustedes son lo más importante de mi vida.
- A mi hermano Antonio por ser mi mejor amigo desde hace 18 años y recordarme que siempre se puede seguir siendo un niño.
- A mis amigos Nadia, Héctor, Carlos, Gastón, Carmen e Iván por ser como mi familia adoptiva y hacer que más de una ocasión nos corrieran de la biblioteca por andarnos riendo.
- A la Dra. Graciela y la Dra. Claudia por tener la dedicación de ir más allá de los deberes académicos en infinidad de ocasiones.
- A Marla, Elba, Marylena y Nallely por brindarme su ayuda en la realización de este proyecto y aguantar que no dejamos de hablar en el laboratorio.
- A la UABC en especial al laboratorio de Farmacología Marina y la FIAD por ser mi segundo hogar durante estos años.

Índice

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	12
II. Hipótesis	15
III. Objetivo	16
III. 1 Objetivo General	16
III. 2 Objetivos específicos.....	16
IV. Metodología	16
IV.1. Diseño general de la metodología de detección	17
IV.2 Preparación de extractos crudos a partir de <i>Mytilus californianus</i>	21
IV.3 Aplicación, desarrollo y revelado en placas cromatográficas.....	21
IV.4 Cuantificación del AD mediante un sistema electrónico.	25
V. Análisis estadístico	26
VI. Resultados	27
VI.1 Diseño general de la metodología de detección.....	27
VI.1.1 Soporte mecánico	27
VI.1.2 Fase estacionaria.....	27
VI.1.3 Fase móvil.....	28
VI.2.1 Aplicación, desarrollo y revelado en las placas cromatográficas.....	30
VI.3.1 Cuantificación del AD mediante un sistema electrónico.	39
VII. Discusión	42
VIII. Conclusiones	53
IX. Referencias	54

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	Estructura característica de la familia de los cainoides.....	3
2	Estructura química del ácido domoico (AD).....	3
3	Estructura química del ácido kaínico.....	4
4	Interacción entre AD y el ácido glutámico con los receptores ionotrópicos de la membrana neuronal. Se muestran los iones involucrados para cada tipo de receptor (Adaptada de Lefevbre Robertson, 2010).....	5
5	Esquema del desarrollo de una cromatografía en capa fina.....	9
6	<i>Mytilus edulis</i> organismo común en los casos de intoxicación por AD.....	12
7	Cámara de desarrollo para las placas cromatográficas. Se muestran la distancia entre el nivel de la fase móvil y el punto de aplicación.....	20
8	Relación entre la distancia recorrida por el spot (b) y la distancia máxima del solvente (a) medidas desde el punto de origen (c).....	23
9	Diagrama de flujo de la metodología utilizada para optimizar el sistema analítico de separación del AD y el ácido kaínico.....	24
10	Prototipo de sistema electrónico estableciendo los niveles mínimos de luz al medir un cromatograma blanco.....	26

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

11	Cromatogramas de mezcla Si60-2 desarrollados con sistema móvil Sol-S4. De Izquierda a derecha se muestran el AD, ácido kaínico y prolina.....	31
12	Cromatograma de μ celulosa desarrollado en el sistema Sol-C4. De Izquierda a derecha, mezcla con 3 aminoácidos (L-lisina, prolina y ácido kaínico), ácido kaínico y ácido domoico.....	32
13	Cromatograma comercial Si 60 desarrollado en un sistema Sol-S3. De izquierda a derecha, prolina, AD y mezcla de 4 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico y AD).....	33
14	Cromatograma comercial desarrollado con un sistema Sol-S1. De Izquierda a derecha se muestran los spots de ácido kaínico, prolina y AD.....	34
15	Cromatograma de μ celulosa desarrollado con un sistema Sol-C1. De izquierda a derecha se muestra una mezcla de 3 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico), ácido kaínico y AD.....	35
16	Cromatograma de μ celulosa desarrollado en sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (12:2:3) Sol-C2. De izquierda a derecha se encuentra mezcla de 3 aminoácidos (L-lisina, prolina y ácido kaínico), ácido kaínico y AD.....	36

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

17	Respuesta durante el desarrollo de la reacción con el agente de revelado. Se muestra la disminución en el voltaje conforme avanza el tiempo de medición.....	37
18	Cromatograma con una placa cromatográfica comercial desarrollado con un sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3). Fue cargado con extracto crudo de <i>Mytilus californianus</i> (1), una mezcla de 4 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico y AD) (2), ácido kaínico (3), metionina (4), y AD (5).....	38
19	Representación del comportamiento lineal del sensor.....	40
20	Respuesta del sensor en voltaje digital a distintas cantidades de AD.....	40
21	Cromatograma desarrollado con el sistema final 7:2:3. De izquierda a derecha se muestra al ácido kaínico, una mezcla de 4 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico y AD) y AD.....	41
22	Placa cromatográfica fabricada en plástico polimérico utilizando μ Celulosa.....	42
23	Cromatograma desarrollado en sistema 4:1:1 fabricado con Si gel 60 G sin agentes aglutinantes adicionales.....	45

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

24	Comparación entre tinción con el agente de revelado de los cromatogramas fabricados con distintas fases estacionarias. Microcelulosa (a) y Si 60 (b). Se muestran los aminoácidos lisina, prolina, kaínico y domoico.....	46
25	Cromatograma desarrollado con una placa cromatográfica comercial y un sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3). Se muestra una comparación entre una concentración de 50 ppm y 100 ppm.....	50
26	Cromatograma cargado con extracto de <i>mytilus californianus</i> (izquierda) y ácido domoico 400 ppm (derecha).....	51

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Página</i>
1 Composición de fases estacionarias.....	18
2 Resultados del análisis cualitativo de las placas cromatográficas realizadas en el laboratorio.....	28
3 Principales sistemas de solventes utilizados en el desarrollo de los cromatogramas.....	29
4 Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3), utilizando la mezcla Si60-2.....	30
5 Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3), utilizando la mezcla μ Cel-1...	32
6 Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (4:1:1), utilizando placas cromatográficas comerciales.....	33
7 Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (3:1:1), utilizando placas cromatográficas comerciales.....	34
8 Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (8:2:3), utilizando la mezcla μ Cel-3.....	35

LISTA DE TABLAS (Continuación)

9	Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (12:2:3), utilizando la mezcla μ Cel-1.....	36
10	Comparación entre valores de R_f del AD y el ácido kaínico en distintas fases móviles para placas cromatográficas comerciales...	38
11	Datos obtenidos de distintas concentraciones de AD($n = 5$).....	41
12	Valores de resolución entre AD y ácido kaínico utilizando distintas fases móviles.....	42
13	Características fisicoquímicas de los analitos a separar mediante el sistema analítico.....	47

I. Introducción

Se denomina marea roja al fenómeno caracterizado por cambios de coloración en el mar con distintas tonalidades que van desde amarillo a tonos de rojo a través de un crecimiento explosivo de microorganismos denominado “floración algal”. Estos microorganismos, conocidos como fitoplancton, se encuentran suspendidos en la capa superficial de los océanos y tienen la capacidad de utilizar la energía del sol, agua, bióxido de carbono y nutrientes para realizar fotosíntesis (Cabrales, 2010).

De las 5000 especies de fitoplancton marino reportadas, 300 de ellas son capaces de colorear la superficie del mar mediante crecimientos excesivos provocados por surgencias costeras, eutrofización de sistemas costeros y distintos factores ambientales (Bower, *et al.*, 1981; Smayda, 1997; Hallegraeff, 1995; Anderson *et al.*, 2002).

La eutrofización de los ecosistemas marinos es reconocida como una de las mayores causas de los florecimientos algales y se le relaciona directamente con el incremento de los mismos en los últimos años. El término eutrofización se refiere al deterioro de los cuerpos de agua mediante el incremento elevado de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Este enriquecimiento puede ser de origen natural o antropogénico y tiene como consecuencia un desbalance en el crecimiento de biomasa de algunas especies además de provocar condiciones hipóxicas en el medio (Anderson *et al.*, 2002)

En determinadas ocasiones no bien definidas aún, las floraciones algales tienen como resultado la liberación de metabolitos naturales conocidos como ficotoxinas, por lo que se les denomina florecimiento algal nocivo (FAN). Hasta la fecha se han reportado 75 especies capaces de liberar dichas toxinas entre las que se encuentran dinoflagelados, cianobacterias y diatomeas. Las ficotoxinas son capaces de desplazarse por las cadenas tróficas causando distintos cuadros clínicos en otros organismos (Campas *et al.*, 2007).

En los moluscos, estas ficotoxinas se acumulan en las glándulas digestivas sin causarles ningún efecto tóxico. Sin embargo, cuando las aves, mamíferos marinos o seres humanos consumen una cantidad suficiente de alimentos marinos contaminados, la intoxicación ocasiona enfermedades neurológicas o gastrointestinales (Campas *et al.*, 2007; Grant *et al.*, 2010).

En general, las ficotoxinas con mayor relevancia son las toxinas de mariscos que se agrupan conforme a los síntomas que ocasionan en los seres humanos al consumirse. Así, se encuentran los síntomas que incluyen parálisis (PSP, Paralytic shellfish poisoning) cuadros diarreicos (DSP, Diarrheal shellfish poisoning), amnesia retrógrada (ASP, Amnesic shellfish poisoning), efectos neurotóxicos (NSP, Neurotoxic shellfish poisoning) y azaspirácidas (AZP, Azaspiracid poisoning) (Lindahl, 1998).

La intoxicación amnésica por mariscos o ASP también conocida como intoxicación por ácido domoico (DAP, domoic acid poisoning), es causada por

esta ficotoxina perteneciente a la categoría de los cainoides (Figura 1), una clase de aminoácidos naturales no proteicos que comparten características estructurales, como lo son el núcleo formado por una pirrolidina y dos grupos carboxilo (FAO, 2005; Jung, 2006). Los cainoides han sido ampliamente estudiados por su uso en insecticidas, medicamentos antihelmínticos y por su actividad neuroexcitatoria en el sistema glutamatérgico (Jung, 2006)

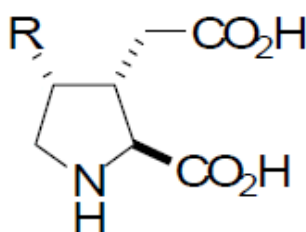


Figura 1. Estructura característica de la familia de los cainoides.

El ácido domoico (Fig. 2) es una potente neurotoxina producida naturalmente por distintas especies de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* y algunas especies de rodofitas. Posee un peso molecular de 311 g mol^{-1} , estabilidad en altas temperaturas y una alta solubilidad en agua (Lefebvre & Robertson, 2010).

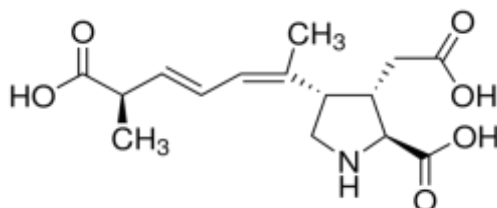


Figura 2. Estructura química del ácido domoico (AD).

El ácido domoico (AD) es un aminoácido heterocíclico con 3 grupos carboxilo que posee una alta solubilidad en agua y una estructura química similar a la de otros compuestos como el ácido kaínico (Figura 3) y el ácido glutámico (FAO, 2005; Costa *et al.*, 2010). Poco se conoce sobre la biosíntesis de esta toxina en *Pseudo-nitzschia*, aunque se sabe que su producción requiere de altos niveles de ATP (Lelong *et al.*, 2012).

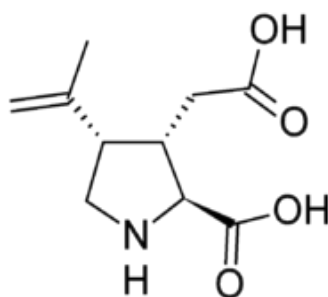


Figura 3. Estructura química del ácido kaínico.

El mecanismo de toxicidad del ácido domoico se debe a su similitud estructural con el ácido glutámico y el ácido aspártico. De la misma manera que otros compuestos neurotóxicos de la familia de los cainoides como el ácido kaínico, el AD actúa como agonista al interactuar con los receptores glutámicos (Glu_r) incluyendo los AMPA, receptores NMDA y los receptores de kainato (Figura 4). Estos 3 tipos de receptores ionotrópicos se ubican en las terminales de las células nerviosas y son responsables de distintas actividades sinápticas. Al consumir organismos con altas concentraciones de AD se incrementa la actividad de los receptores glutámicos desencadenando respuestas

neurodegenerativas y apoptosis (Lefebvre & Robertson, 2010; Doble, 1999; Jung, 2006).

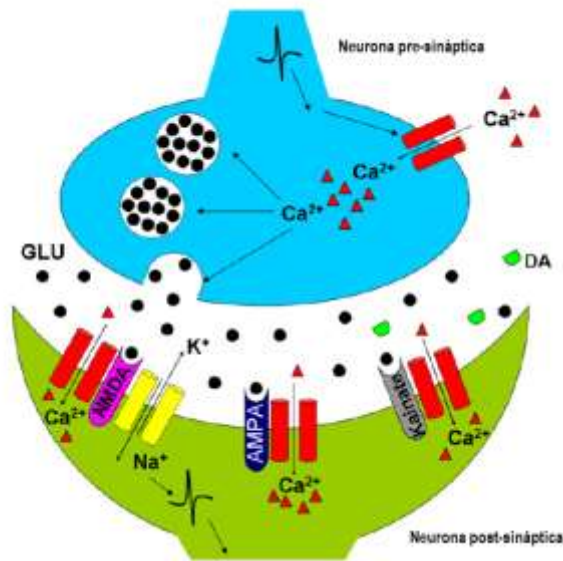


Figura 4. Interacción entre AD y el ácido glutámico con los receptores ionotrópicos de la membrana neuronal. Se muestran los iones involucrados para cada tipo de receptor (Adaptada de Lefebvre & Robertson, 2010).

Después de la ingestión de organismos contaminados, el ácido domoico se une a los receptores glutámicos NMDA (N-metil-D-aspartato), ubicados en el sistema nervioso central, con una afinidad 3 veces más fuerte que la del ácido kaínico y 100 veces más que el ácido glutámico. Esto se debe a que el AD no es liberado por la neurona, a diferencia del ácido glutámico, provocando que la despolarización sea más larga de lo debido y causando un incremento en la concentración intraneuronal de calcio (Lelong *et al.*, 2012).

Cuando las concentraciones de AD aumentan la actividad enzimática dependiente de calcio se ve afectada por estos cambios de concentración que derivan en muerte celular para las neuronas situadas en el área del hipocampo, lo que conlleva a padecer amnesia anterógrada y da origen al nombre del padecimiento (Lelong et al., 2012).

Los síntomas de intoxicación por ácido domoico en los seres humanos incluyen vómito, diarrea, cefalea intensa, calambres, ataxia, alucinaciones, confusión y pérdida de memoria, aunque existen reportes de casos de inducción al coma e incluso la muerte causados por altas dosis de la toxina. No se conoce antídoto alguno para la intoxicación amnésica por moluscos y dadas las altas concentraciones de ácido glutámico y aspártico en el tejido de los moluscos, resulta más tóxico ingerir AD mediante organismos contaminados que puro (Grant et al., 2010; Lelong et al., 2012).

Como consecuencia de los primeros sucesos de ASP muchos países declararon como concentración límite para el consumo de mariscos contaminados 20 µg de ácido domoico/g de tejido. En los años siguientes al suceso en la Isla Príncipe Eduardo se registraron más casos sobre intoxicación en zonas costeras, pero es hasta 1991 cuando por primera vez se documentan los efectos neurológicos de la toxina en algunas aves silvestres en el área de california (Work, 1993).

En la actualidad los niveles de ácido domoico más altos registrados fueron encontrados en vieiras (*Pecten maximus*) de las regiones costeras de Irlanda en el año 2005, alcanzando concentraciones de 2,820 ppm (James *et al.*, 2005). Lo cual solo causó conciencia en las autoridades internacionales acerca de las regulaciones necesarias para evitar la intoxicación por el consumo de productos contaminados.

Para la zona de Baja California los florecimientos de *Pseudo-nitzschia australis* representan un foco de atención para el monitoreo de la intoxicación amnésica por moluscos. Estos florecimientos podrían ser más frecuentes y específicos de la zona pues se ha demostrado que la tendencia al enfriamiento del agua en la parte superior del Golfo de California juega un papel importante en los brotes de ASP (Ochoa *et al.*, 2002).

Debido al peligro por intoxicación se tiene claro que la detección del ácido domoico se vuelve esencial para todos aquellos sectores involucrados en la producción, venta o consumo de mariscos bivalvos como ostras, mejillones y almejas, así como para las larvas de crustáceos y peces con escamas comercialmente importantes (FAO, 2005).

Existen medidas internacionales de regulación para la venta, importación y exportación de productos marinos que podrían estar contaminados. De manera general se utilizan métodos analíticos durante los eventos de marea roja para la identificación de la toxina. Organizaciones como la Asociación

Oficial de Químicos Agricultores (AOAC por sus siglas en inglés), aprueban al ensayo ELISA con una sensibilidad de 30 ng/ml como el procedimiento estándar para cuantificar los niveles de ácido domoico (Etienne *et al.*, 2006)

Uno de los métodos estándar más utilizados por distintas agencias de regulación es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), aunque existen otros estudios que incluyen bioensayos en ratones, ensayos de unión receptor específicos, el método Quillian basado en una cromatografía líquida acoplada a un detector de luz UV (Etienne *et al.*, 2006), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, detectores SPR (surface plasmon resonance) tanto portátiles (Stevens *et al.*, 2007) como no portátiles (Lotierzo *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005), además de dispositivos de detección basados en anticuerpos desarrollados por la compañía Jellett Biotek.

Desafortunadamente, aunque los métodos para la cuantificación del ácido domoico están disponibles comercialmente, la mayoría resultan una inversión elevada para los pequeños productores ya que a excepción de los dispositivos de Jellett Biotek, se requiere equipo y personal especializado para lograr a cabo una medición eficaz. De lo anterior se desprende que es necesaria la creación de un sistema de detección destinado a resolver la problemática de detección oportuna para el sector pesquero mediante una prueba rápida, sensible y de bajo costo.

La cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), es una técnica de cromatografía líquida de tipo planar que es utilizada en lo general para el análisis semi-cuantitativo de distintas especies químicas mediante su separación a partir de mezclas más complejas. Dicha separación está basada en la polaridad tanto de los compuestos a separar como de las placas de cromatografía y la fase móvil. Conforme la fase móvil sube por capilaridad a través de la placa, los compuestos de mayor afinidad a esta última se presentarán en lugares más alejados al punto de origen que aquellos que presentan una interacción química con la fase estacionaria (Figura 5) (Stahl, 1968).

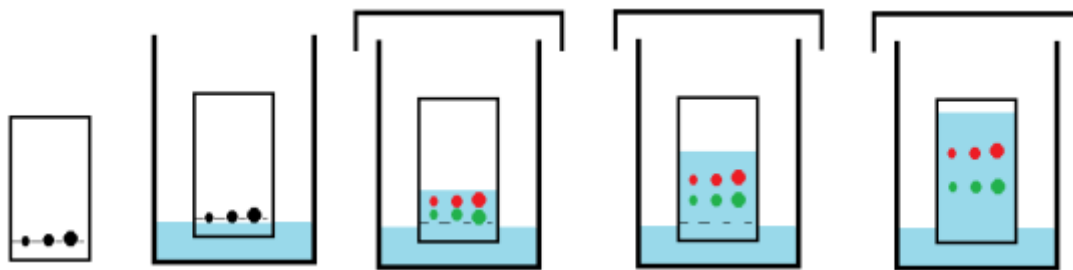


Figura 5. Esquema del desarrollo de una cromatografía en capa fina.

Dado su bajo costo y relativamente alta resolución, la cromatografía en capa fina suele ser útil para los laboratorios que no cuentan con un sistema HPLC. Un inconveniente para la separación de ácido domoico por medio de capa fina, es la existencia de aminoácidos como el ácido kaínico que interfieren en la separación si se encuentran presentes en un extracto crudo contaminado con AD. Por lo anterior, los procedimientos de limpieza son obligatorios y

representan altos costos dada la necesidad de equipo de laboratorio especializado para las empresas productoras (Quilliam *et al.*, 1998).

Una vez desarrolladas con la fase móvil, las placas de cromatografía producidas suelen ser reveladas utilizando agentes químicos que puedan reaccionar con el analito para obtener una coloración detectable mediante sus propiedades ópticas en el espectro visible. Los agentes reveladores (R) utilizados suelen tener mecanismos de detección relacionados con un grupo químico en específico, y en algunos casos un mismo agente revelador permite tener distintas tonalidades para analitos con estructuras similares (Egon, 1998).

El cromóforo formado por la reacción del analito con el agente revelador posee características ópticas dadas por los principios de espectroscopía molecular. Cuando el complejo recibe la radiación electromagnética, puede absorber un fotón, incrementando su energía en una cantidad igual a la energía del fotón. Las moléculas son altamente selectivas respecto a las frecuencias que absorben. Sólo fotones de ciertas frecuencias específicas son absorbidos por una molécula (Carey, 2006).

La reacción del ácido kaínico y ácido domoico con algunos agentes de revelado forma un compuesto que posee características ópticas que permiten distinguirlos fácilmente de otros complejos en una muestra biológica. Posteriormente utilizando el pico de absorbancia del complejo AD+R es posible lograr su cuantificación mediante la ley de Lambert-beer basada en la relación

entre la concentración y la absorbancia de una especie química. El límite de detección para el ácido domoico mediante la cromatografía en placa fina es de aproximadamente 10 ppm, por lo que la sensibilidad de la técnica es suficiente para el análisis de organismos con el mínimo de la concentración máxima permitida de 20 ppm de AD (Quilliam *et al.*, 1998).

Para la implementación la técnica de cromatografía en capa fina los extractos crudos de organismos marinos contaminados resultan demasiado complejos para poder lograr una separación y análisis de los analitos, haciendo necesario un proceso de purificación acoplado a un sistema de separación cromatográfica específico para lograr una distinción del AD entre los principales aminoácidos de interferencia, mismos que reaccionan de manera similar con la solución de revelado como es el caso del ácido kaínico.

Una vez lograda la separación cromatográfica una de las opciones más efectivas para el análisis de la técnica de TLC es la utilización de instrumentos de escaneo por densitometría. Estos dispositivos son sistemas ópticos utilizados para la cuantificación de compuestos en cromatogramas a través de la medición de la absorbancia, reflectancia o fluorescencia. La densitometría permite hacer un barrido en el cromatograma para detectar los cambios ópticos provocados por la presencia de los distintos compuestos (Striegel & Hill, 1996). Este principio de densitometría permite el diseño de un sistema de análisis basado específicamente en las características ópticas del complejo AD+R.

II. Antecedentes

El ácido domoico fue aislado por primera vez de la macroalga *Chondria armata* en el año de 1958 por Takemoto y Daigo mientras se investigaban las propiedades insecticidas en extractos de algas. (Lefebvre & Robertson, 2010). Sus efectos tóxicos fueron identificados por primera vez en 1987 cuando después de un florecimiento de *Pseudo-nitzschia multiseries* alrededor de 143 personas presentaron síntomas y 4 fallecieron al consumir mejillones *Mytilus edulis* (Figura 6) cosechados en la zona costera de la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá (Lefebvre, 2002). Antes de este suceso el ácido domoico no se consideraba una toxina y no existían registros de diatomeas como productoras de este compuesto neurotóxico (Lelong *et al.*, 2012).



Figura 6. *Mytilus edulis* organismo común en los casos de intoxicación por AD.

Como resultado de un programa de vigilancia presentado al este de Canadá, el ácido domoico fue encontrado en mejillones (*Mytilus edulis*) de la Bahía de Fundy en 1989. En 1991 se produjo la primera floración tóxica por *Pseudo-nitzschia* registrada en la costa del Pacífico de los Estados Unidos. Más

de 100 pelícanos pardos (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes de Brandt (*Phalacrocorax penicillatus*) murieron ese mismo año en Bahía de Monterey, California, después de haber comido anchoas contaminadas por *Pseudo-nitzschia australis*. También se encontraron altas concentraciones de ácido domoico en cangrejos, almejas y mejillones en muchos otros sitios en los Estados Unidos (Mos, 2001).

Durante 1991-1994, las floraciones de *Pseudo-nitzschia australis* fueron más comunes a lo largo de la costa del Pacífico y en 1996 se reportaron organismos intoxicados por ácido domoico, tales como el cangrejo Dungeness sp, anchoas y sardinas (Mos, 2001).

Hasta el momento no se han informado casos de envenenamiento por ácido domoico en las aguas europeas, aunque algunas especies de *Pseudo-nitzschia* han producido pequeñas cantidades de ácido domoico. En Australia, Nueva Zelanda, Corea, Japón y Vietnam, no hay registros sobre florecimientos de *Pseudo-nitzschia* a altas concentraciones, por lo que el ácido domoico no ha llegado a ser perjudicial para la salud humana (Mos, 2001).

Los primeros registros sobre la toxicosis en mamíferos marinos fueron reportados en 1998 (Montie, 2012). Durante el mismo año se documentaron las primeras bacterias capaces de metabolizar el AD (*Aeromonas* y *Pseudomonas*), presentes en el tejido de mejillones azules (*Mytilus edulis*). Hasta la fecha la nutria marina (*Enhydra lutris*), es el único organismo con la capacidad de evitar

la intoxicación por AD mediante lo que se cree es un sistema de reconocimiento basado en el olfato (Mos, 2001).

En 1998 se registró un florecimiento algal que afectaría la zona costera mexicana en el estado de Baja California. Durante este evento fueron registrados varamientos de lobos marinos que rápidamente fueron asociados con el fenómeno de El Niño aunque luego se comprobó que estos sucesos fueron efecto de un florecimiento de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* (Herrera, 2002). De nueva cuenta, en 2002 se registraron varamientos de lobos marinos en las costas de Baja California; esto representó uno de los primeros focos de alarma en la zona y creó conciencia en los involucrados sobre los efectos nocivos de la toxina (Herrera, 2002).

Con la necesidad de salvaguardar la salud pública surgieron distintos métodos para el censado de las distintas ficotoxinas producidas durante los florecimientos algales. Para la ASP la mayoría de los métodos utilizados en la detección están basados en el uso de técnicas cromatográficas HPLC y TLC (para TLC solo se ha reportado un análisis semi-cuantitativo), sensores de tecnología *surface plasmon resonance* (SPR), y técnicas basadas en inmunoensayos ELISA (Bin Abdul, 2009).

Desde los primeros casos de ASP, uno de los métodos más usados para medir los niveles de contaminación por AD es el bioensayo del ratón para intoxicación parálitica por mariscos, sin embargo este método tiene un límite de

detección de 40 ppm superior al límite permitido para el consumo humano de 20 ppm (FAO, 2005)

Utilizando la técnica de cromatografía en capa fina para separar al AD de otros compuestos y aplicando un agente revelador, en el presente trabajo se propone un método de análisis que permita cuantificar la cantidad de toxina mediante la lectura del complejo AD + R por medio de la señal óptica emitida por el analito.

Este trabajo fue desarrollado en conjunción con el diseño de un sistema electrónico que permitirá captar y transformar la señal óptica en una lectura que permita cuantificar la cantidad de la toxina.

II. Hipótesis

- La separación cromatográfica del ácido domoico mediante la manipulación de la polaridad de sus grupos funcionales permite obtener un valor de R_f adecuado para evaluar mediante sensores ópticos, de manera precisa, selectiva y reproducible, la absorbancia óptica de un complejo generado por adición de agentes químicos al ácido domoico (AD+R).

III. Objetivo

III. 1 Objetivo General

Diseñar una metodología que haga posible la separación del ácido domoico a partir de un extracto biológico procesado permitiendo tras un proceso de revelado cuantificar la cantidad del mismo mediante la lectura y transformación de la señal óptica.

III. 2 Objetivos específicos

- Seleccionar un material con las características adecuadas para un fácil manejo del dispositivo y una óptima medición de la señal óptica.
- Identificar la fase estacionaria idónea para la realización de la separación cromatográfica de los analitos.
- Determinar la composición de la fase móvil del sistema bioquímico para mejorar la separación diferencial del ácido domoico y otros compuestos estructuralmente parecidos.
- Analizar los requerimientos mínimos del extracto biológico para lograr la cuantificación del ácido domoico.

Establecer las condiciones de tiempo y temperatura para optimizar la operación del sistema bioquímico en la cuantificación del ácido domoico.

IV. Metodología

La metodología de separación que fue realizada para la creación del sistema analítico está acoplada con el proceso de construcción de un sensor

óptico. La conjunción de ambos sistemas tuvo implicaciones en el diseño y se traduce en varias decisiones tomadas para la optimización de la técnica y la mejor cuantificación del analito.

IV.1. Diseño general de la metodología de detección

El sistema analítico consistió en: 1) un soporte mecánico, 2) fase estacionaria o adsorbente y 3) una fase móvil. Adicional a esto se utilizó un agente revelador para lograr la cuantificación de los analitos.

La elección tanto del soporte mecánico como de la fase estacionaria idónea se realizó teniendo en mente la naturaleza del sensor y los componentes electrónicos encargados de la lectura de la señal óptica. A continuación se muestran los distintos procedimientos realizados para cada etapa.

1) Soporte mecánico.

Dada la necesidad de permitir el paso de la señal óptica generada a partir de la interacción de luz UV con el complejo AD+R, se descartó la utilización de aluminio, como soporte para la fase estacionaria.

Para encontrar un soporte mecánico capaz de contener la matriz para colocar los reactivos, se probaron dos materiales distintos con características ópticas idóneas para la cuantificación. Fueron utilizados como soporte para la fase estacionaria un plástico polimérico y vidrio. Para el vidrio, se usaron placas

de 2.5 x 7.5 cm. Para el plástico, el material fue recortado en placas de 3 x 8 cm.

2) Fase estacionaria.

Se probaron placas cromatográficas con 2 fases estacionarias distintas, microcelulosa cristalina 20 μ m y gel de sílice 60. Para la fabricación de los cromatofolios se probaron distintas concentraciones y mezclas con ambas fases estacionarias así como la adición de aglutinantes para proporcionarle mayor resistencia a las placas de cromatografía (Tabla 1). Las placas cromatográficas fueron preparadas en el Laboratorio de Toxicología y Farmacología Marina utilizando celulosa “Sigmacell Cellulose” tipo 20, 20 μ m de Sigma y Silica Gel 60 G EM SCIENCE.

Tabla 1. Composición de fases estacionarias.

Mezcla	Aglutinante 1	Aglutinante 2	Segundo adsorbente
μ Cel-1	---	---	---
μ Cel-2	1%	---	0.1 gr/ml
μ Cel-3	---	---	0.05 gr/ml
Si 60-1	---	---	---
Si 60 -2	---	0.19%	---
Si 60 -3	2%	---	---

Para la fabricación de placas cromatográficas con las fases estacionarias mencionadas en la tabla 1, el protocolo de preparación fue el siguiente:

Las placas de cromatografía se prepararon en grupos de 10 o 20 con el fin de evitar que la fase estacionaria cambiase sus propiedades con respecto al

tiempo de preparación y agitación. Fueron preparados a, temperatura ambiente y a excepción de las mezclas μ Cel-1, μ Cel-2 y μ Cel-3 se mantuvo una agitación constante durante la preparación y aplicación de las mismas sobre el soporte. Dada la influencia de la agitación para la solución de microcelulosa en la adsorción de la muestra y la adhesión al soporte, se mantuvo un tiempo de homogeneización fijo de 150 segundos.

Para cubrir las placas se tomó 1 ml de la mezcla y se aplicó lentamente en un borde del soporte mecánico previamente lavado y secado con acetona. Una vez aplicado se distribuyó a lo largo de toda la placa mediante pequeños movimientos del vidrio, cuidando que la mezcla quedara esparcida homogéneamente.

Habiendo distribuida la mezcla se colocó la placa en una plancha de calentamiento a 60°C durante 10 minutos para pasar a ser almacenada en una estufa de calentamiento a 50 °C. Las placas cromatográficas preparadas fueron almacenadas durante 24 horas antes de ser utilizados en las pruebas de separación.

Para la calibración del sensor óptico se optó por utilizar placas comerciales de vidrio EMD Millipore de Silica gel 60 F254 nm 5 x 10 cm como fase estacionaria por sobre las fabricadas en el laboratorio.

3) Fase móvil.

Mediante un análisis químico de los principales aminoácidos de interferencia para la medición, se determinó que los sistemas de solventes ácidos serían la mejor opción para iniciar con la optimización de la fase móvil. Se utilizó un sistema 3:1 Alcohol A: ácido orgánico para las placas de μ celulosa y Alcohol B: ácido orgánico: agua, para las placas cromatográficas de Si Gel 60. Posteriormente se manejaron diversas modificaciones a dichos sistemas además de aplicarse en distintos tipos de placas cromatográficas, e incluso se experimentó la utilización de compuestos básicos para lograr cambios significativos de pH.

La fase móvil fue colocada en la cámara de desarrollo con un volumen determinado dado que al introducir la placa en la cámara el nivel del solvente no debe estar por encima del punto de aplicación y lave el spot antes de que inicie el proceso de separación (Figura 7).



Figura 7. Cámara de desarrollo para las placas cromatográficas. Se muestran la distancia entre el nivel de la fase móvil y el punto de aplicación.

IV.2 Preparación de extractos crudos a partir de *Mytilus californianus*.

Los organismos fueron colectados de playa Punta Morro en Ensenada, Baja California y se prepararon extractos de acuerdo a una variación del método reportado por Quilliam *et al.* (1995). Una vez extraído el tejido fue homogeneizado durante 3-5 minutos en una solución 1:4 de metanol utilizando un tubo de plástico de 50 ml para centrifuga y un homogenizador de tejido (Polytron PT 2100). El mismo procedimiento fue realizado utilizando una mezcladora convencional como homogenizador.

Como una alternativa a la centrifugación convencional, el homogenado fue dejado en reposo en un refrigerador a 5 °C durante 5 horas. Para finalizar la preparación se tomaron 5 ml del sobrenadante que fueron limpiados a través de un proceso de filtración. El extracto fue cargado con una concentración conocida de AD para su posterior cuantificación y comparación con estándares de la misma concentración.

IV.3 Aplicación, desarrollo y revelado en placas cromatográficas

Para el proyecto se trabajaron 4 aminoácidos; Lisina, prolina, ácido kaínico y ácido domoico, además un extracto de *Mytilus californianus*. Se aplicaron hasta 3 spots distintos por placa de cromatografía.

Para realizar las corridas cromatográficas fue primero necesario activar las placas cromatográficas elevando la temperatura a 100 °C. Posteriormente las placas fueron marcadas y mediante una micropipeta se agregaron los

analitos a separar a un 1cm de distancia del inicio de la placa. En todos los casos se utilizaron soluciones estándar de los aminoácidos, L-prolina, L-lisina, ácido kaínico monohidratado y ácido domoico en concentraciones de 400 ppm. Una vez aplicados se utilizó aire caliente para secar el spot antes de que pasara a la cámara de desarrollo.

La placa cromatográfica fue llevada a la cámara de desarrollo que contiene el sistema de solventes, y se le deja durante un tiempo aproximado de 10 -15 min. El tiempo de desarrollo está relacionado con las características físicas de la fase estacionaria por lo que varía en las distintas placas cromatográficas utilizados en el proyecto.

Pasado el tiempo de desarrollo las placas cromatográficas fueron llevadas a una placa de calentamiento para retirarles el solvente que queda en ellos. Inmediatamente después se procedió a aplicar el agente de revelado en las placas mediante un atomizador. Para acelerar el proceso de revelado la placa fue de nuevo llevada a la plancha de calentamiento y removida una vez que el spot mantiene una fuerza suficiente para su observación. A la placa de cromatografía ya revelada se le denominará cromatograma.

Para determinar el funcionamiento de cada sistema de solventes se utilizó el valor R_f (relación de frentes) (Ec. 1), de los analitos como indicador (Figura 8), este indicador es la relación entre la distancia recorrida del spot y la distancia máxima de la fase móvil ambas medidas tomadas a partir del punto de

aplicación del analito. La resolución (Ec. 2) entre la separación de los spots es otro parámetro de gran interés para obtener el mejor sistema de solventes. Se utilizó un Vernier y software de edición de imágenes para medir las placas cromatográficas.

$$Rf_{spot} = \frac{b}{a} \quad (1)$$

$$Resolucion = \frac{d}{\frac{w_1 + w_2}{2}} \quad (2)$$

Donde:

a = Distancia recorrida por el solvente

b = Distancia recorrida por el analito

Donde:

d = Distancia entre dos analitos

w₁ = ancho del spot (analito₁)

w₂ = ancho del spot (analito₂)

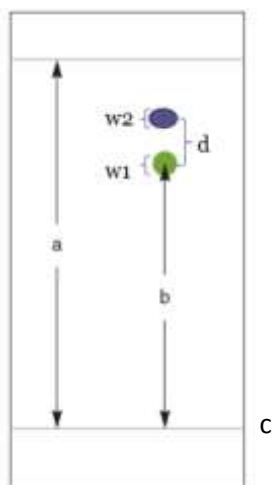


Figura 8. Relación entre la distancia recorrida por el spot (b) y la distancia máxima del solvente (a) medidas desde el punto de origen (c).

La figura 9 esquematiza el procedimiento utilizado para encontrar la mejor conjunción entre fase estacionaria y fase móvil, obteniendo la separación óptima para la cuantificación en el sistema electrónico.

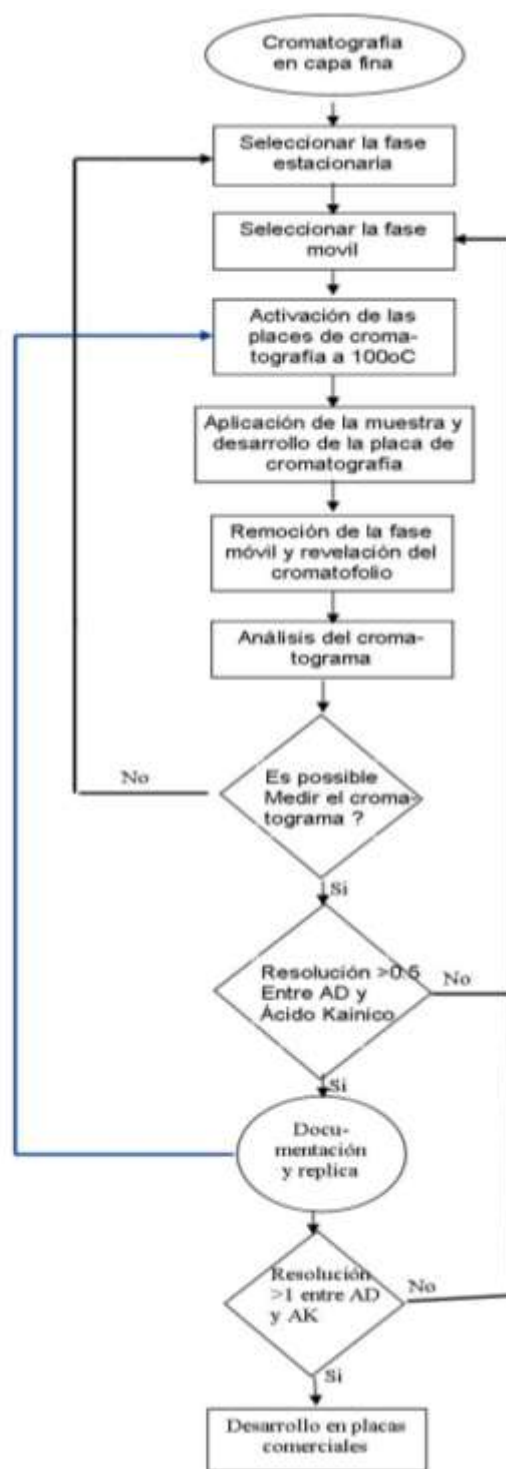


Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para optimizar el sistema analítico de separación del AD y el ácido kaínico.

IV.4 Cuantificación del AD mediante un sistema electrónico.

Una vez seleccionada la fase estacionaria y la fase móvil, se estandarizó el proceso de aplicación, desarrollo y revelado de las placas de cromatografía para la calibración del sistema electrónico.

Mediante la utilización del sensor electrónico basado en fotodetectores se capturaron los valores de la luz incidente emitidos por un LED con longitud de onda específica para su interacción con el complejo AD+R. Posteriormente se realizó el análisis de los valores arrojados por el sensor. A través de una interfaz creada en Visual Basic fue posible alterar distintos parámetros para lograr optimizar la medición. La intensidad del LED utilizada en la calibración del sensor fue de 0.6 mA con un tiempo de integración de 50 ms.

Para las placas de cromatografía comerciales destinadas a la calibración del sensor se realizaron 3 réplicas de 5 concentraciones distintas de AD, 50, 100, 200, 300 y 400 ppm, así como una serie de cromatogramas blanco. Para la cuantificación del AD se aumento el volumen al cargar la muestra usando 2 µl para todas las concentraciones.

Una vez aplicada la muestra, los cromatogramas mantuvieron un tiempo de desarrollo de 14 minutos, para posteriormente retirar el exceso de solvente utilizando una plancha térmica a 60 °C durante 9 minutos.

Habiendo removido la fase móvil, se aplicó el agente de revelado y se dejó reposando en la plancha térmica a 60°C. Después de 2 min enfriándose a

temperatura ambiente el cromatograma fue colocado en el prototipo de sensor óptico (Figura 10), en una posición previamente definida por la distancia que recorre el analito y el ancho del mismo, de tal forma que el spot quedase justo por encima de los píxeles centrales.

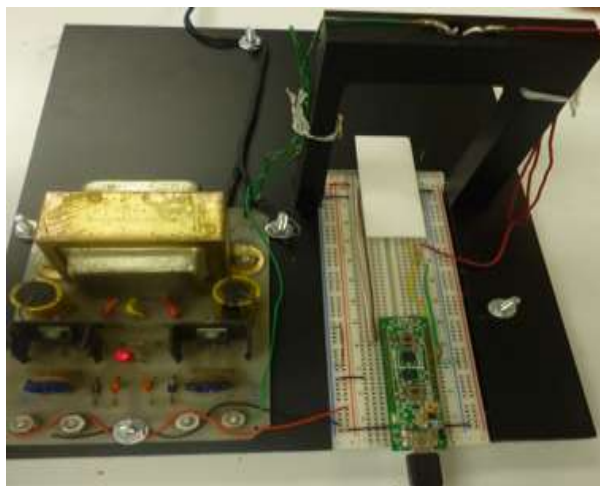


Figura 10. Prototipo de sistema electrónico estableciendo los niveles mínimos de luz al medir un cromatograma blanco.

Como último ensayo se cargaron los extractos procesados de *Mytilus californianus* en las placas de cromatografía para conocer la respuesta del sensor en condiciones donde se tienen mezclas biológicas complejas.

V. Análisis estadístico

Para determinar el comportamiento normal de los datos se realizó la prueba de Shapiro–Wilk y la prueba de Bartlett para evaluar homogeneidad de varianzas. Se realizaron análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar si existen diferencias significativas entre los paquetes de datos

obtenidos para los diferentes analitos y solventes. De igual manera, esta prueba se realizó para evaluar la capacidad de compactación de la fase estacionaria en cada mezcla de solventes. Para analizar la validez de la Ley de Beer-Lambert, y la sensibilidad de la respuesta del sensor, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

VI. Resultados

VI.1 Diseño general de la metodología de detección

VI.1.1 Soporte mecánico

El soporte seleccionado fueron las placas de vidrio de tamaño 2.5 x 7.5 cm. Mediante un análisis cualitativo y durante la realización de este trabajo se deja ver que el vidrio presenta mejores características físicas para el manejo del sistema analítico en general, además de que mantiene características ópticas idóneas para la cuantificación mediante el sistema electrónico.

VI.1.2 Fase estacionaria

Al inicio de la experimentación se utilizó μ cel-1 por sus características químicas y su buena adhesión al soporte, además se planteó la posibilidad de hacer menor el tiempo de desarrollo dada la marcada diferencia entre la distancias máximas en un sistema 4:1:1 Alcohol B: ácido orgánico: agua en comparación con la mezcla inicial de Si60-1. Los resultados de los primeros cromatogramas fabricados con μ celulosa son mostrados en la sección VI.2.

La tabla 2 contiene características de interés mostradas por las distintas placas cromatográficas realizados con las mezclas propuestas. La resistencia de las placas de cromatografía durante la inmersión en la fase móvil y la adhesión son factores necesarios para lograr un proceso de desarrollo y revelado que produzca resultados reproducibles, mientras que la absorción se relaciona con la cuantificación del spot en el sistema electrónico.

Tabla 2. Resultados del análisis cualitativo de las placas cromatográficas realizadas en el laboratorio.

	μCel-1	μCel-2	μCel-3	Si 60-1	Si60-2	Si60-3
Resistencia	SI	SI	NO	NO	SI	NO
Adhesion	SI	SI	NO	NO	MEDIA	SI
Distancia*	6.3	4.1	5.1	4.5	4.6	4.2
Adsorción	BAJA	MEDIA	MEDIA	ALTA	ALTA	ALTA

*Distancia promedio alcanzada por el solvente Alcohol B: ácido orgánico: agua

Las mezclas que utilizan microcelulosa como matriz principal presentaron mejores características físicas que aquellas compuestas por Si 60. Sin embargo, es la capacidad de adsorción de la muestra, mejores características ópticas y la resolución lograda lo que estableció a la mezcla Si60-2 como la matriz óptima para las placas cromatográficas.

VI.1.3 Fase móvil

Para la composición de la fase móvil se seleccionaron sistemas ácidos de solventes alcohólicos para la separación de los aminoácidos. Cada sistema estuvo constituido por un alcohol de cadena corta, un ácido orgánico y agua.

La utilización de un alcohol de cadena de longitud mediana produjo cromatogramas bien definidos aunque requiere tiempos de desarrollo más largos. Alcoholes más pequeños (C3) no mostraron la capacidad de producir una resolución suficiente para la medición y en algunos casos ni si quiera una separación para los analitos.

Tomando como base los valores de Rf obtenidos en pruebas preliminares, se seleccionaron algunos sistemas para la realización de nuevas cromatografías. La tabla 3 muestra los principales sistemas de solventes utilizados en el desarrollo de los cromatogramas con sus respectivas fases estacionarias.

Tabla 3. Principales sistemas de solventes utilizados en el desarrollo de los cromatogramas.

		Proporción del sistema		
Fase Estacionaria	Código	Alcohol de cadena mediana	Ácido orgánico	Agua
Celulosa	Sol-C1	8	2	3
	Sol-C2	12	2	3
	Sol-C3	14	3	3
	Sol-C4	7	2	3
Silica Gel 60	Sol-S1	3	1	1
	Sol-S2	7	2	3
	Sol-S3	4	1	1
	Sol-S4	7	3	3

VI.2.1 Aplicación, desarrollo y revelado en las placas cromatográficas.

En la fase estacionaria fabricada con Si60-2 se encontró que el sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3) permite obtener una resolución de 0.926 ± 0.130 ($n = 5$), un valor que se reporta entre el rango de resolución de 0.5-1.5 necesario para realizar un análisis por densitometría. La tabla 4 y la figura 11 muestran los resultados de los cromatogramas realizados.

Tabla 4. Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3), utilizando la mezcla Si60-2.

Ácido Domoico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	3.55	3.6	3.6	3.55	3.6	3.580
Distancia del Solvente	4.6	4.5	4.6	4.55	4.55	4.560
Anchura del spot	0.3	0.3	0.3	0.275	0.275	0.290
Rf	0.708	0.742	0.722	0.718	0.732	0.725

Ácido Kainico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	3.350	3.350	3.300	3.300	3.350	3.330
Distancia del Solvente	4.500	4.500	4.550	4.550	4.600	4.540
Anchura del spot	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
Rf	0.671	0.671	0.648	0.648	0.653	0.658

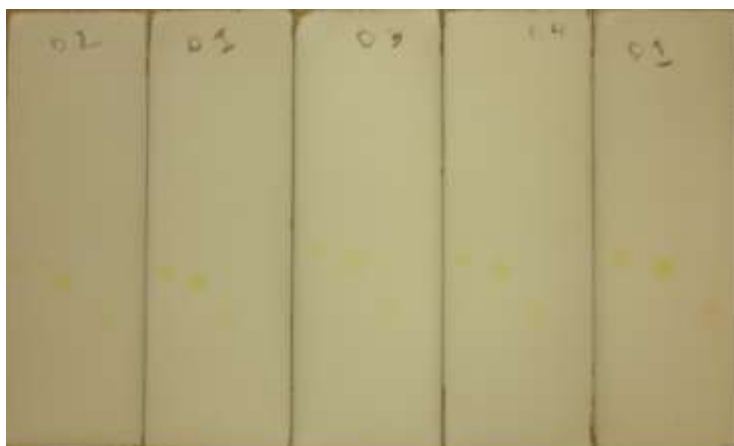


Figura 11. Cromatogramas de mezcla Si60-2 desarrollados con sistema móvil Sol-S4. De izquierda a derecha se muestran el AD, ácido kaínico y prolina.

El mismo sistema Alcohol B: ácido orgánico: agua (Solución C4) utilizado en placas de cromatografía compuestas por μ celulosa produjo separaciones menos definidas con una resolución de apenas 0.68 ± 0.169 . Sin embargo, es la resolución más alta obtenida para los cromatogramas fabricados con esta fase estacionaria. En la figura 12 y la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de los cromatogramas desarrollados por este sistema.

Las tablas 6, 7, 8, y 9 presentan los resultados de los cromatogramas desarrollados durante la experimentación de la fase móvil. Cada uno de estos sistemas utiliza una fase estacionaria específica. Las figuras 13, 14, 15 y 16 muestran la visualización de cada sistema respectivamente.

Tabla 5. Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3), utilizando la mezcla μ Cel-1.

Ácido Domoico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	5.300	5.400	5.350	5.400	5.600	5.410
Distancia del Solvente	6.700	6.800	6.700	6.750	6.800	6.750
Anchura del spot	0.500	0.600	0.600	0.500	0.600	0.560
Rf	0.754	0.759	0.763	0.765	0.793	0.767

Ácido Kaínico	600 ppm					Promedio
Distancia del spot	5.100	5.000	4.900	5.000	5.200	5.040
Distancia del Solvente	6.700	6.800	6.700	6.750	6.650	6.720
Anchura del spot	0.500	0.500	0.500	0.500	0.600	0.520
Rf	0.719	0.690	0.684	0.696	0.743	0.706



Figura 12. Cromatograma de μ celulosa desarrollado en el sistema Sol-C4. De Izquierda a derecha, mezcla con 3 aminoácidos (L-lisina, prolina y ácido kaínico), ácido kaínico y ácido domoico.

Tabla 6. Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (4:1:1), utilizando placas cromatográficas comerciales.

Acido Domoico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	2.3	2.3	2.35	2.3	2.3	2.310
Distancia del Solvente	3.8	3.9	3.8	4.1	3.85	3.890
Anchura del spot	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.200
Rf	0.464	0.448	0.482	0.419	0.456	0.454

Acido Kainico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	2	2	2	2.1	2	2.020
Distancia del Solvente	3.9	3.9	3.8	3.9	3.85	3.870
Anchura del spot	0.2	0.2	0.2	0.2	0.25	0.210
Rf	0.344	0.344	0.357	0.379	0.350	0.355



Figura 13. Cromatograma comercial Si 60 desarrollado en un sistema Sol-S3. De izquierda a derecha, prolina, AD y mezcla de 4 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico y AD).

Tabla 7. Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (3:1:1), utilizando placas cromatográficas comerciales.

Ácido Domoico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	2.4	2.35	2.35	2.35	2.35	2.360
Distancia del Solvente	3.8	3.85	3.8	3.8	3.85	3.820
Anchura del spot	0.175	0.175	0.175	0.175	0.2	0.180
Rf	0.500	0.473	0.482	0.482	0.473	0.482

Ácido Kainico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	2.25	2.2	2.25	2.2	2.2	2.220
Distancia del Solvente	3.85	3.85	3.8	3.85	3.85	3.840
Anchura del spot	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.150
Rf	0.438	0.421	0.446	0.421	0.421	0.430

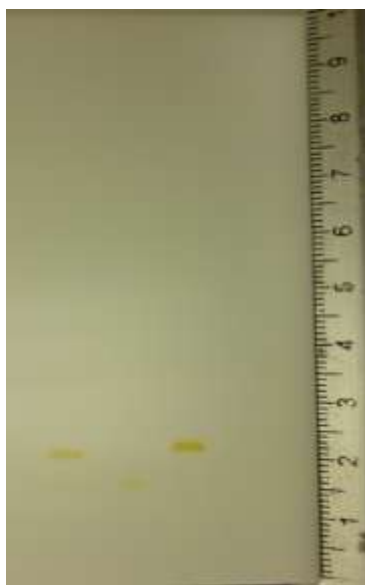


Figura 14. Cromatograma comercial desarrollado con un sistema Sol-S1. De Izquierda a derecha se muestran los spots de ácido kaínico, prolina y AD.

Tabla 8. Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (8:2:3), utilizando la mezcla μ Cel-3.

Acido Domoico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	5.600	5.500	5.700	5.600	5.600	5.600
Distancia del Solvente	6.500	6.800	6.700	6.850	6.800	6.730
Anchura del spot	0.500	0.700	0.700	0.600	0.600	0.620
Rf	0.836	0.776	0.825	0.786	0.793	0.803

Acido Kainico	600 ppm					Promedio
Distancia del spot	5.100	5.200	5.500	5.400	5.300	5.300
Distancia del Solvente	6.750	6.850	6.900	6.850	6.800	6.830
Anchura del spot	0.700	0.600	0.600	0.700	0.600	0.640
Rf	0.713	0.718	0.763	0.752	0.741	0.737



Figura 15. Cromatograma de μ celulosa desarrollado con un sistema Sol-C1. De izquierda a derecha se muestra una mezcla de 3 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico), ácido kaínico y AD.

Tabla 9. Datos obtenidos de cromatogramas desarrollados con un sistema de Alcohol:ácido orgánico:agua (12:2:3), utilizando la mezcla μ Cel-1.

Acido Domoico	400 ppm					Promedio
Distancia del spot	5.600	5.500	5.900	5.600	5.600	5.640
Distancia del Solvente	6.750	6.850	6.900	6.850	6.800	6.830
Anchura del spot	0.800	0.800	0.800	0.800	0.700	0.780
Rf	0.800	0.769	0.831	0.786	0.793	0.796

Acido Kainico	600 ppm					Promedio
Distancia del spot	4.700	5.100	5.200	5.000	5.300	5.060
Distancia del Solvente	6.750	6.850	6.900	6.850	6.800	6.830
Anchura del spot	0.700	0.700	0.700	0.800	0.800	0.740
Rf	0.643	0.701	0.712	0.684	0.741	0.696

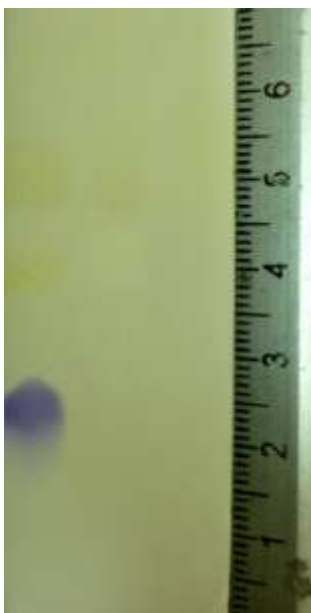


Figura 16. Cromatograma de μ celulosa desarrollado en sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (12:2:3) Sol-C2. De izquierda a derecha se encuentra mezcla de 3 aminoácidos (L-lisina, prolina y ácido kaínico), ácido kaínico y AD.

La figura 17 muestra los cambios de voltaje digital obtenidos por el sensor al medir un cromatograma blanco al cual no se le dio un tiempo de calentamiento tras el revelado. La medición realizada en distintos tiempos revela que a temperatura ambiente de 18°C aproximadamente el tiempo mínimo para la medición debe de ser de 15 min, siendo 35 min el ideal para asegurar una menor diferencia entre mediciones.

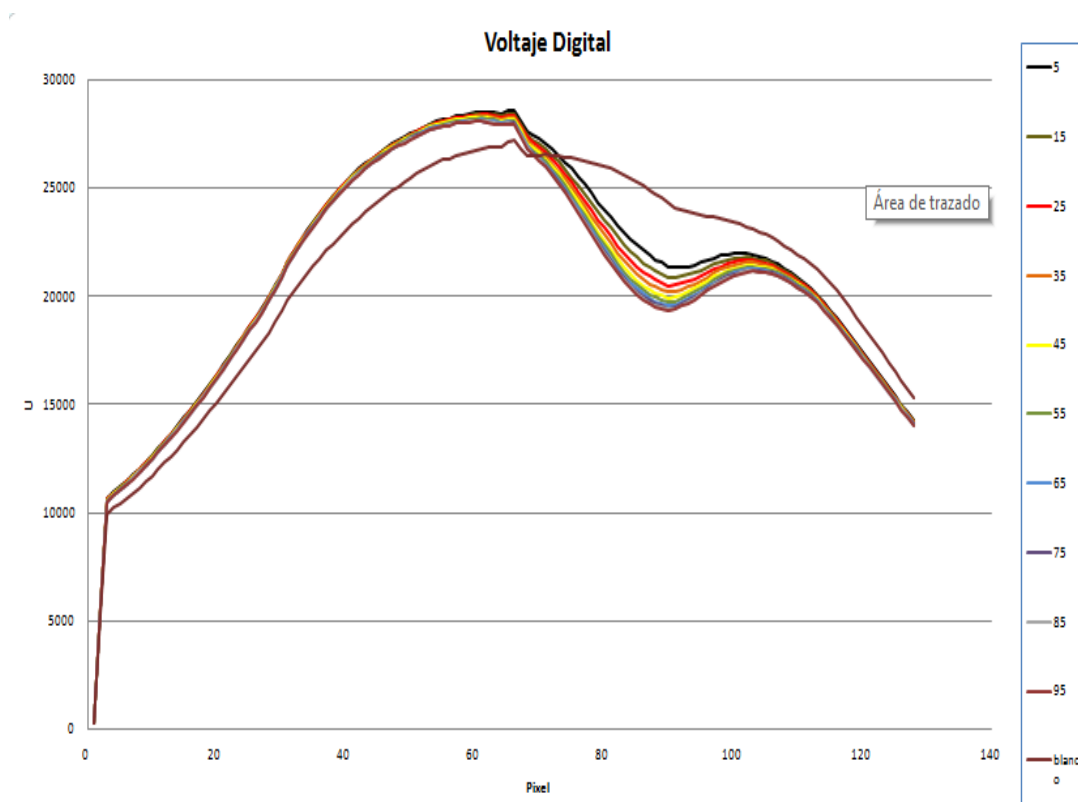


Figura 17. Respuesta durante el desarrollo de la reacción con el agente de revelado. Se muestra la disminución en el voltaje conforme avanza el tiempo de medición.

El análisis del extracto crudo obtenido en una placa cromatográfica comercial desarrollada durante un tiempo mayor en 1 minuto que todas las demás cromatografías se muestra en la figura 18. El carril 1 presenta el extracto inyectado con AD a una concentración de 100 ppm. No se detectó ácido domoico en la posición correspondiente para un sistema Alcohol: ácido orgánico: agua (7:2:3), sino un spot con un tenue tono violeta. Se incluyó un estándar de metionina para el análisis del extracto.

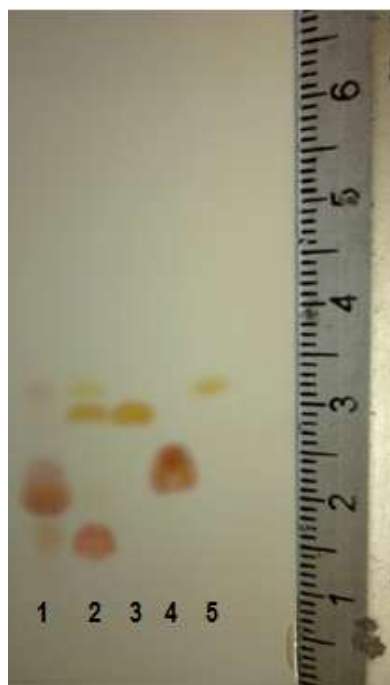


Figura 18. Cromatograma con una placa cromatográfica comercial desarrollado con un sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3). Fue cargado con extracto crudo de *Mytilus californianus* (1), una mezcla de 4 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico y AD) (2), ácido kaínico (3), metionina (4), y AD (5).

VI.3.1 Cuantificación del AD mediante un sistema electrónico.

Se cuantificaron los niveles de AD en los cromatogramas comerciales usando el sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3), utilizando un sistema electrónico que fue construido y diseñado para trabajar con los parámetros establecidos en este trabajo.

En la tabla 10 se muestran los valores de *Rf* obtenidos para el ácido domoico según el sistema de solventes utilizado. Para las distintas concentraciones cargadas en las placas cromatográficas comerciales no se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en los *Rf* obtenidos con la fase móvil Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3).

Tabla 10. Comparación entre valores de *Rf* del AD y el ácido kaínico en distintas fases móviles para placas cromatográficas comerciales.

Valores de <i>Rf</i> de distintos analitos					
Solvente	Alcohol:ácido orgánico:agua	7:2:3	4:1:1	3:1:1	14:3:6
AD	a	0.4464	0.4643	0.5000	0.6364
	b	0.4727	0.4483	0.4737	0.6176
	c	0.4554	0.4655	0.4821	0.5882
	d	0.4630	0.4561	0.4643	0.6418
	e	0.4545	0.4561	0.4737	0.6364
	Promedio	0.4584	0.4581	0.4788	0.6241
KAI	a	0.357	0.357	0.446	0.576
	b	0.345	0.345	0.421	0.559
	c	0.357	0.345	0.446	0.544
	d	0.370	0.386	0.446	0.567
	e	0.364	0.351	0.421	0.561
	Promedio	0.3587	0.3567	0.4362	0.5612

La respuesta del sensor se muestra lineal, el voltaje digital incrementa conforme aumenta la cantidad de AD en la muestra ($r^2 = 0.988$) (Figura 19). La figura 19 muestra la medición total de 128 píxeles al interactuar con el AD; se puede observar una mayor disminución del voltaje digital registrado por el sensor, conforme aumenta la cantidad de AD en el spot (Figura 20).

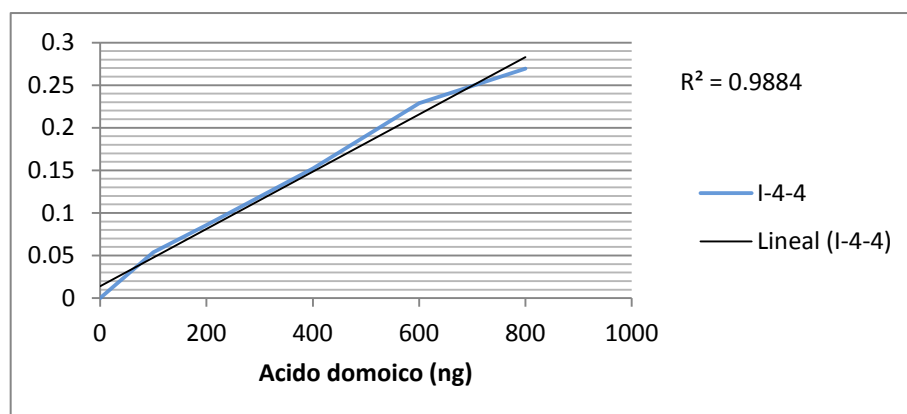


Figura 19. Representación del comportamiento lineal del sensor.

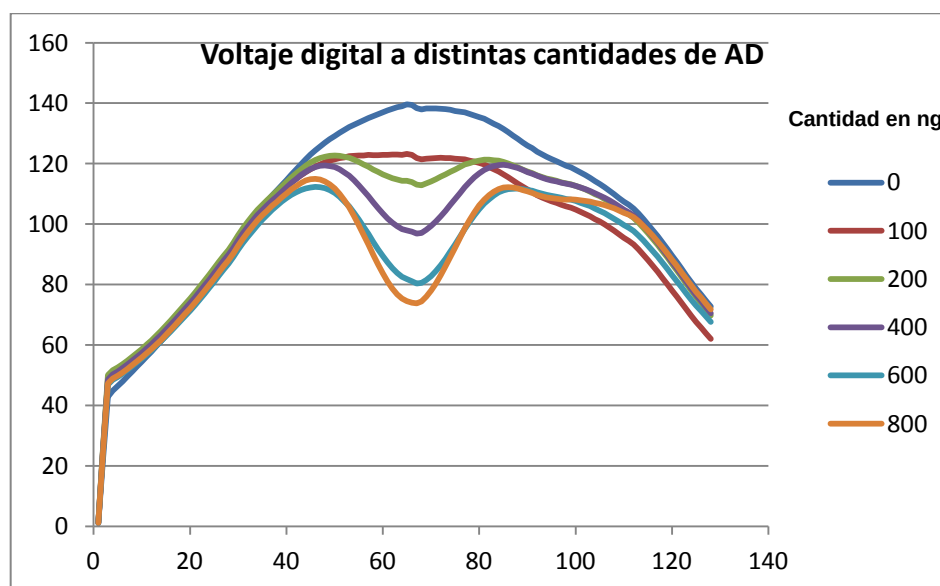


Figura 20. Respuesta del sensor en voltaje digital a distintas cantidades de AD.

La tabla 11 muestra los datos recabados de las 5 réplicas para cada concentración de AD utilizadas en la calibración del sistema electrónico (Figura 20).

Tabla 11. Datos obtenidos de distintas concentraciones de AD (n =5).

AD (ppm)	50	100	200	300	400	Promedio
Distancia del spot	2.250	2.267	2.233	2.233	2.283	2.253
Distancia del Solvente	3.700	3.800	3.783	3.750	3.783	3.763
Anchura del spot	0.150	0.150	0.150	0.200	0.200	0.172

La resolución promedio de la separación cromatográfica entre el AD y el ácido kaínico para el sistema 7:2:3 (Figura 21) (Tabla 12) fue de 1.48 ± 0.108 , el valor más alto obtenido durante la realización de este trabajo. La tabla 12 muestra la comparación los valores obtenidos en la resolución utilizando distintas fases móviles en placas cromatográficas comerciales.



Figura 21. Cromatograma desarrollado con el sistema final 7:2:3. De izquierda a derecha se muestra al ácido kaínico, una mezcla de 4 aminoácidos (L-lisina, prolina, ácido kaínico y AD) y AD.

Tabla 12. Valores de resolución entre AD y ácido kaínico utilizando distintas fases móviles.

Valores de resolución en distintas fases móviles					
	Placa	7:2:3	4:1:1	3:1:1	14:3:6
Si Gel 60	a	1.467	1.500	0.923	0.889
	b	1.600	1.500	0.923	0.889
	c	1.571	1.750	0.923	0.750
	d	1.333	1.000	0.857	1.111
	e	1.429	1.333	0.857	1.111
	Promedio	1.4800	1.4167	0.8967	0.9500

VII. Discusión

Al evaluar los soportes para utilizarlos en las placas cromatográficas el plástico polimérico demostró ser un material con características ópticas ligeramente superiores al dejar pasar una mayor cantidad de luz, además de presentar flexibilidad y la misma resistencia que el vidrio a la temperatura y el pH utilizados en este trabajo (Figura 22).



Figura 22. Placa cromatográfica fabricada en plástico polimérico utilizando μ Celulosa.

Sin embargo el vidrio presenta una mayor facilidad de manejo dada la rigidez del material. Lo anterior permite que el proceso de aplicación de la muestra y manipulación de la placa de cromatografía sea más sencillo para el usuario.

La facilidad de manejo de las placas de cromatografía en vidrio resulta una característica más apreciable tomando en cuenta la finalidad del sensor de ser sistema fácil de implementar para cualquier empresa productora. Además, es posible aumentar la intensidad del LED mediante modificaciones en el sensor para obtener una resolución similar a la del plástico en las placas de vidrio.

Para mantener un mejor control en la separación se fabricaron las placas cromatográficas en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina. Esto presenta ventajas sobre las placas de cromatografía comerciales pues permite la variación entre parámetros como el grosor, composición química, concentración y resistencia de la fase estacionaria.

Cuando se inició la experimentación con la fase estacionaria, la microcelulosa cristalina fue la primera opción para la realización de las placas cromatográficas. Descrita como una fase estacionaria óptima para la separación de compuestos hidrofílicos mediante la interacción con sus grupos hidroxilo, además de tener un mejor comportamiento para la separación de aminoácidos, incluyendo mayor sensibilidad, tiempo de reacción con el agente revelador y

resolución, este material representaba un posible éxito en la producción del soporte.

Sin embargo, las primeras pruebas no mostraron spots lo suficientemente definidos como para lograr una medición, y se atribuyó inicialmente este problema a la fase móvil utilizada. Aún cambiando a sistemas de solventes reportados para lograr ciertos valores de R_f en soluciones estándar, la microcelulosa no presentaba la resolución suficiente para lograr una correcta cuantificación de los analitos.

Al repetir los sistemas de solventes en placas de Si 60, los resultados fueron positivos pues aún con los sistemas menos precisos se obtuvieron spots más definidos y con valores de R_f para el ácido domoico más cercanos a lo reportado previamente (Quilliam *et al.* , 1998).

Por otro lado, las placas de Si Gel 60, ya sea por su preparación o por la falta de aglutinante no lograron adherirse del todo cuando se usaba como soporte las placas de μ celulosa (Figura 23), por lo que fue necesario incluir un aglutinante en la mezcla (con lo que se incrementó el nivel que ya de antemano viene incorporado en la especie comercial), y experimentar con un segundo aglutinante capaz de provocar un entrecruzamiento para la fase estacionaria.



Figura 23. Cromatograma desarrollado en sistema 4:1:1 fabricado con Si gel 60 G sin agentes aglutinantes adicionales.

Un punto a destacar es la homogeneización de la fase estacionaria durante la fabricación de las cromatogramas. Esta variación solo fue distinguible mediante la utilización del sensor electrónico que registró diferencias en la cantidad de luz que dejaron pasar los cromatogramas. Por lo tanto no son óptimas para realizar una cuantificación del analito.

En las mediciones realizadas para este trabajo no se registraron variaciones en las placas fabricadas que estuvieran relacionadas con la homogeneidad de la fase estacionaria.

Los cromatogramas fabricados con μ Celulosa respondieron con una coloración distinta a la reacción con el agente de revelado haciendo imposible

comparar los resultados de la cuantificación de AD en una fase contra la otra (Figura 24).

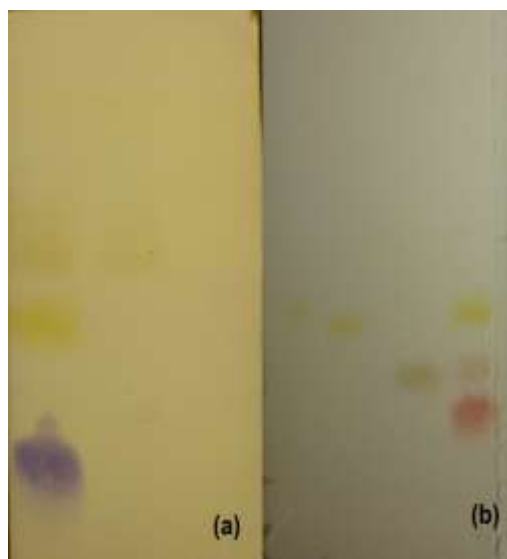


Figura 24. Comparación entre tinción con el agente de revelado de los cromatogramas fabricados con distintas fases estacionarias. Microcelulosa (a) y Si 60 (b). Se muestran los aminoácidos lisina, prolina, kaínico y domoico

Aunque no es un aminoácido que interfiera en la cuantificación, la L-lisina fue utilizada en la mayoría de las placas cromatográficas como un aminoácido que permitiera un punto de comparación entre sistemas de solventes cuyas composiciones fueran distintas. Dadas sus características fisicoquímicas, este compuesto presenta una sensibilidad mucho menor a los cambios en la proporción en la fase móvil, proporcionando valiosa información durante el análisis de los cromatogramas.

Dado que el ácido domoico y el ácido kaínico presentan una solubilidad baja en comparación a otros aminoácidos, ambos presentan comportamientos parecidos al interactuar con la fase móvil. Estos dos analitos poseen estructuras similares y sus P.I son ligeramente distintos haciendo muy difícil su separación mediante cambios de pH en el sistema (Tabla 13). Dado que todos los pKa de los analitos se mantienen en valores ácidos, proveerles de un medio con un intervalo de pH 3-4, permite una mejor resolución al sistema.

Tabla 13. Características fisicoquímicas de los analitos a separar mediante el sistema analítico.

Aminoácido	PM	pKa₁	pKa₂	pKa₁	PI	Solubilidad
A. Domoico	115.13 Da	1.85	4.47	4.75	3.16	10 mg/ml
A. Kaínico	213.3 Da	1.96	6.02	--	3.27	10 mg/ml
Prolina	311.33 Da	1.99	--	--	6.48	50 mg/ml

En el trabajo presentado por Quillam *et al.* (1998), no se discute la necesidad de un sistema especializado para separar estos dos analitos, el sistema 3:1:1 (Alcohol:ácido orgánico:agua), reporta un valor de Rf = 0.45 y en placas cromatográficas comerciales presentó una resolución de 0.89 ± 0.036 (n=5) aceptable para lograr una cuantificación en un sistema de densitometría pero no suficiente para ser utilizada en el sensor electrónico.

Habiendo establecido al alcohol utilizado como alcohol de cadena corta ideal para la separación, se lograron spots mas definidos y al incrementar la cantidad de agua se logra una mayor resolución entre los analitos al aumentar

su proporción en el sistema. Dada la baja miscibilidad de la fase móvil hasta este punto se elevó la proporción de ácido acético, sin llegar a notar efectos negativos como la formación de caudas en los spots.

Cada combinación de fase móvil y fase estacionaria produjo resultados distintos, por lo que un extenso análisis empírico fue necesario. Para todos los cromatogramas la cámara de desarrollo estuvo cerrada para propiciar la saturación de gases y mejorar la separación. Aunque se planteó la utilización de papel filtro en la cámara para lograr una mejor separación, para el diseño final del dispositivo sensor es preferible realizar una técnica de desarrollo vertical para los cromatogramas, pues no se ve afectada por la saturación de gases en la cámara.

El tiempo de desarrollo se estableció para lograr valores de R_f entre 0.4 y 0.8, además de ajustar que el proceso general requiriese de menos de 30 minutos para llevarse a cabo. Mediante el uso de las placas cromatográficas fabricadas en el laboratorio obtuvimos un tiempo de desarrollo mayor no tiene influencia significativa en la resolución de la separación para mezclas de compuestos puros.

Para los cromatogramas utilizados en el análisis del extracto crudo se aumento el tiempo de desarrollo con el fin de propiciar una mejor separación entre los componentes del extracto.

La temperatura para llevar a cabo el proceso de revelado de la placa de cromatografía es un factor muy importante para el diseño final del dispositivo, ya que el tiempo necesario para lograr cierta estabilidad en la reacción sobrepasa los 20 minutos, se tomó la decisión de utilizar una plancha térmica para acelerar la reacción de revelado. Sin embargo, el tiempo aplicado para todos los cromatogramas podría no haber sido suficiente para llegar a la totalidad de la reacción en las concentraciones as altas.

Mantener el cromatograma expuesto a 70°C durante tiempos más prolongados o aumentar la temperatura por encima de este rango probó que es posible afectar la sensibilidad del cromatograma a los contaminantes exteriores, propiciando la formación de manchas a lo largo de todo el spot.

Con esta observación, es conveniente señalar que es necesario tener en consideración que el sistema electrónico posee una sensibilidad a la temperatura capaz de alterar la cuantificación del ácido domoico, por lo que un tiempo fijo de enfriamiento fue necesario. Como la temperatura ambiente durante la realización de este trabajo se mantuvo alrededor de los 18°C las placas fueron cubiertas para ser enfriadas a esta temperatura durante un tiempo de reposo de 2 minutos.

A estos dos parámetros de temperatura para el proceso de revelado y temperatura máxima aceptada por el sensor electrónico, se les atribuye la variación en los datos recabados por el sensor electrónico.

Un sistema cerrado con un control más preciso de la temperatura durante el desarrollo, la remoción de fase móvil y el revelado, es necesario si se desea un sistema capaz de cuantificar con exactitud el AD. La variación en cualquiera de los tiempos causaría un cambio solo perceptible para el sensor y por lo tanto una cuantificación errónea.

En el caso de los cromatogramas de Si 60, tanto comerciales como los fabricados en el laboratorio que fueron desarrollados con el sistema de solventes final 7:2:3, incluso la concentración más baja trabajada de AD de 50 ppm es claramente visible en el cromatograma sin necesidad de equipo especial (Figura 25).



Figura 25. Cromatograma desarrollado con una placa cromatográfica comercial y un sistema Alcohol:ácido orgánico:agua (7:2:3). Se muestra una comparación entre una concentración de 50 ppm y 100 ppm.

El ensayo final que utiliza un extracto de *Mytilus californianus* cargado con AD estableció que no es posible lograr una separación cromatográfica eficaz utilizando los mínimos requerimientos de purificación (Figura 26). Inclusive el proceso de preparación de extractos utilizando equipo no especializado resultó insuficiente para lograr homogenizar el tejido y dar paso al proceso de filtración.

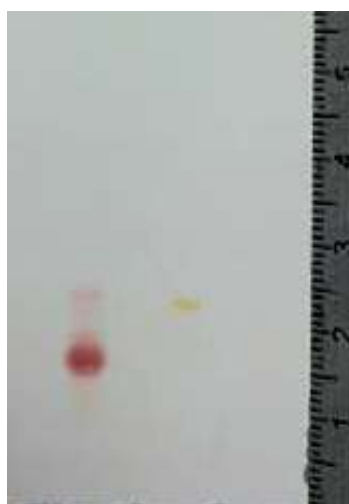


Figura 26. Cromatograma cargado con extracto de *mytilus californianus* (izquierda) y ácido domoico 400 ppm (derecha).

Se plantea que cuando menos un proceso de centrifugación diferencial debe de ser realizado para separar posibles componentes biológicos que estén interactuando con el AD.

Los valores reportados de R_f para aminoácidos esenciales indican que la valina con un $R_f = 0.44$ en un sistema 3:1:1 sería el aminoácido de interferencia

primordial que esta sobreponiéndose en el spot de AD en el cromatograma (Reach Devices, 2010).

Es necesario realizar un análisis sobre el efecto que tendrían estos aminoácidos en la cuantificación del AD, puesto que la luz emitida por el LED es de una longitud de onda específica para el pico de absorción del complejo AD+R. Dada la complejidad del extracto es necesario realizar un análisis más detallado una vez completada la construcción del dispositivo cerrado donde se llevara a cabo la cuantificación.

VIII. Conclusiones

- Los cromatogramas de μ celulosa no producen una separación suficiente ni poseen la resolución necesaria para lograr la cuantificación del ácido domoico mediante el sistema electrónico.
- La separación cromatográfica en placas de Si 60 entre el ácido kaínico y el ácido domoico posee una resolución suficiente para lograr cuantificación de cada uno.
- El sistema analítico provee una sensibilidad que permite cuantificar la cantidad de ácido domoico hasta concentraciones de 50 ppm.
- Para la cuantificación a partir de extractos crudos es necesario optimizar el proceso de limpieza para remover impurezas que se sobreponen en el spot de ácido domoico.
- Dada la alta sensibilidad del sistema electrónico, las condiciones para el desarrollo de la separación necesitan un mayor control bajo la creación de un sistema cerrado que permita realizar la medición de manera continua.
- La temperatura en la que se lleva a cabo la reacción del AD con el agente revelador necesita ser caracterizada dadas distintas concentraciones del analito, con el fin de optimizar los tiempos de medición.

IX. Referencias

1. Anderson, D.M., P.M. Glibert, & J.M. Burkholder. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25. 704–726.
2. Bower, D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A. & Howden, M. E. H. 1981. Nonprotein neurotoxins. *Clin. Toxicol.* 18: 813-843.
3. Burns, J. M., Schock, T. B., Hsia, M. H., Moeller, P. D., & Ferry, J. L. 2007. Photostability of kainic acid in seawater. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(24), 9951-9955.
4. Cabrales, T. Guadalupe. 2010. Distribución espacial y temporal de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* spp y concentración de ácido domoico en la región de la Bahía de Todos Santos, B.C., México.
5. Campàs, M., Beatriz, P. S. & Marty, J. L. 2007. Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety, *Talanta*, Volume 72, Issue 3, 884-895, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.036>.
6. Carey, F.A. 2006. *Química Orgánica*, 6^{ta} edición. Editorial McGraw-Hill. 530-531.
7. Costa, L. G., Giordano, G., & Faustman, E. M. 2010. Domoic acid as a developmental neurotoxin. *Neurotoxicology*, 31(5), 409-423.
8. Costanzo, S. J. 1997. Optimization of Mobile Phase Conditions for TLC Methods Used in Pharmaceutical Analyses. Procter & Gamble Pharmaceuticals, *Journal of Chromatographic Science*. Vol. 35. New York .
9. Doble, A. 1999. The role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 81, Issue 3, 163-221, ISSN 0163-7258, [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00042-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00042-4).
10. Etienne, M., Ifremer & Nantes. 2006. Domoic acid analysis in bivalve molluscs. *Seafood plus traceability*. France.

11. Food and Agriculture Organization. 2005. Biotoxinas marinas. Estudio FAO: alimentación y nutrición. 2005. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
12. Friedman, M. 2004. Application of the ninhydrin reaction for the analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem* 52: 385–406.
13. Grant, K. S., Burbacher, T. M., Faustman, E. M. & Lynn, G. 2010. Domoic acid: Neurobehavioral consequences of exposure to a prevalent marine biotoxin, *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 32, Issue 2, 132-14.
14. Hallegraeff, G.M. 1995. Harmful algal blooms: a global overview. *In* Hallegraeff, G.M. *et al.* eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
15. James, K.J., Gillman, M., Amandi, M.F., López-Rivera, A., Puente, P.F., Lehane, M., Mitrovic, S. & Furey, A. 2005. Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland, *Toxicon* 46, 852–858.
16. Jung, Y. C., "A new approach to kainoids: Total syntheses of (-)-kainic acid and (+)-allokainic acid" (2006). Graduate School Theses and Dissertations. <http://scholarcommons.usf.edu/etd/2577>.
17. Lefebvre, K. A, Bargu S., Kieckhefer T. & Silver M. W. 2002. From sanddabs to blue whales: the pervasiveness of domoic acid. *Toxicon* 40:971–977.
18. Lefebvre, K..A. & Robertson A. 2010. Domoic acid and human exposure risks: A review, *Toxicon*, Volume 56, Issue 2, 218-230, ISSN 0041-0101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.034>.
19. Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., & Bates, S. S. 2012. Pseudo-nitzschia (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 51(2), 168-216.
20. Lindahl, O. 1998. Occurrence and Monitoring of harmful algae in the

- marine environment. In Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C. & J. Gilbert, eds. 1998. Mycotoxins and phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 409-423. Fort Collins, Colorado, Alaken Press.
21. Lotierzo, M., Henry, O.Y., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B. & Turner, A.P. 2004. Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2), 145–152.
22. Montie, E. W., Wheeler, E., Pussini, N., Battey, T. W.K., Van Bonn W. & Gulland F. 2012. Magnetic resonance imaging reveals that brain atrophy is more severe in older California sea lions with domoic acid toxicosis. *Harmful Algae*, Volume 20, December 2012, pp. 19-29, ISSN 1568-9883, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2012.07.004>
23. Mos, L. 2001. Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9(3), 79-85.
24. Norma, H. 2002. Contingencia ambiental por varamientos extraordinarios de lobos marinos de California. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Gaceta Numero 57.
25. Ochoa, Jose L., Hernández-Becerril, D.U, Lluch-Cota, S., Arredondo-Vega, B.O, E. Nuñez, A., Heredia, J., Pérez & Rodríguez, A. 2002. Marine biotoxins and harmful algal blooms in Mexico's Pacific littoral.
26. Reach Devices. 2010. Thin Layer Chromatography of aminoacids and short peptides. REACH Devices US-made scientific equipment. http://www.reachdevices.com/TLC_aminoacids.html
27. Smayda, T.J. 1997. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1137-1153.
28. Stahl, E. 1998. Thin layer chromatography, 2nd edition, Springer-Verlag

Berlin, Reprint 1988.

29. Stevens, R. C., Soelberg, S. D., Bich-Thuy L. E., Spencer, S., Wekell, J. C., Chinowsky, T. M., Vera, L. T. & Clement, E. F. 2007. Detection of the toxin domoic acid from clam extracts using a portable surface plasmon resonance biosensor. *Harmful Algae*, Volume 6, Issue 2, 166-174, ISSN 1568-9883, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2006.08.001>.
30. Striegel, M. F., & Hill, J. 1996. Thin-layer chromatography for binding media analysis. Visualization, Interpretation, Documentation, and Computer Analysis of Chromatographic Plates .Thin-layer chromatography for binding media analysis. 67-76. <http://books.google.com.mx/books?id=ytFOAgAAQBAJ>.
31. Takemoto, T. & Daigo, K. 1958. Constituents of *Chondria armata*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 6, 578–580.
32. Work, T. M., Barr, B., Beale, A. M., Fritz, L., Quilliam, M. A. & Wright, J. L. C. 1993. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelicanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 54–62.
33. Yu, Q., Shengfu C., Taylor, D. A., Homola, J., Hock, B. & Shaoyi J. 2005. Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 107, Issue 1, 193-201, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2004.10.064>.