

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



DESARROLLO DE UNA PRUEBA *IN SITU* PARA LA DETECCIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO EN MEJILLONES DE
BAJA CALIFORNIA

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ROBERTO LUNA VÁZQUEZ GÓMEZ

Ensenada, Baja California, México

Febrero de 2014.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

DESARROLLO DE UNA PRUEBA *IN SITU* PARA LA DETECCIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO EN MEJILLONES DE
BAJA CALIFORNIA

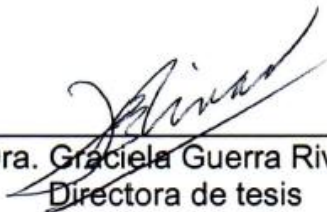
TESIS
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ROBERTO LUNA VÁZQUEZ GÓMEZ

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas
Directora de tesis



Dra. Irma E. Soria Mercado
Sinodal



Dr. Oscar Roberto López Bonilla
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis fue posible gracias al generoso apoyo de CONACyT y la UABC, La Facultad de Ciencias Marinas, el Laboratorio de farmacología Marina y el proyecto que apoyó el desarrollo del trabajo dirigido por la Dra. Graciela Guerra Rivas.

Quiero extender mi más sincero agradecimiento a la Dra. Graciela Guerra Rivas por las intensas horas de trabajo dedicadas a este proyecto, por su apoyo incondicional y su disponibilidad.

Mi respeto y agradecimiento a la Dra. Irma Soria Mercado y el Dr. Oscar Roberto López Bonilla, por su muy apreciable apoyo.

Roberto Luna Vázquez Gómez.
Febrero de 2014.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo se centra en desarrollar una prueba *in situ* basado en cromatografía de capa fina para la detección y cuantificación de ácido domoico (D) en extractos de moluscos de interés comercial, cuya sensibilidad y especificidad cumplan con las normas internacionales.

Se aborda el problema de la detección y cuantificación de D tratando de aportar una solución sencilla y viable. Una serie de soportes y fases estacionarias se sometieron a pruebas de adsorción y flexibilidad para determinar el sistema óptimo. Un soporte de polietilentereftalato (PET) y una fase estacionaria de celulosa microcristalina (CMC) producida en este trabajo mostró tener las propiedades de flexibilidad y adsorción deseables para una prueba *in situ*.

El sistema óptimo de soporte y la fase estacionaria se utilizaron como plataforma cromatográfica de capa fina para la separación y determinación de las relaciones frontales (R_f) de los productos de reacción de un agente químico (N) con ácido domoico (ND), de N con ácido kaínico (NK) y de N con prolina (NP) a partir de estándares de laboratorio de D, ácido kaínico (K), prolina (P) y homogenados etanólicos de *Mytilus californianus*. Se usaron mezclas de disolventes para determinar por aproximaciones sucesivas la proporción óptima para la separación de mezclas. Una solución binaria de acetona alcalina logró separar los productos de reacción en mezclas y estándares. Para el estudio de

las reacciones que producen ND, NK y NP; se realizaron barridos espectrofotométricos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN	II
LISTA DE FIGURAS	VI
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	4
A. CAUSAS DE LAS FAN	4
B. CONSECUENCIAS DE LAS FAN	6
C. ÁCIDO DOMOICO, UNA TOXINA QUE SE PRODUCEN EN LAS FAN	9
D. ESPECIES QUE PRODUCEN ÁCIDO DOMOICO.....	10
E. ASPECTOS MOLECULARES DEL ÁCIDO DOMOICO	12
F. TECNOLOGÍAS APLICADAS A LA DETECCIÓN DE ÁCIDO DOMOICO	13
G. ANÁLISIS DE VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TECNOLOGÍAS ACTUALES PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO DOMOICO	14
H. NECESIDADES DE DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE TOXINAS	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
IV. OBJETIVOS.....	19
A. OBJETIVO DE TRABAJO	19
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
V. HIPÓTESIS.....	20
VI. METODOLOGÍA	20
A. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
B. DESARROLLO DEL SOPORTE	21

C. DESARROLLO DE LA FASE ESTACIONARIA.....	21
D. FASE MÓVL	25
E. CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN QUÍMICA	26
F. CROMATOGRAFÍA	27
VII. RESULTADOS.....	27
A. DESARROLLO DEL SOPORTE Y FASE ESTACIONARIA	27
B. PRODUCTOS DE REACCIÓN	32
C. PROPORCIÓN ÓPTIMA DE SOLVENTES Y CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	50
D. SOLVENTES PRELIMINARES.....	51
E. SERIE ÁCIDO ACÉTICO- ISOPROPANOL.....	52
F. SERIE ACETONA-NAOH.....	55
LA FIG. 29, MUESTRA CÓMO SE LOGRA SEPARAR ND DE M EN UN SISTEMA DE SOLVENTES FORMADO POR ACETONA Y NAOH (0.1 N) 1:2.	55
G. PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MEJILLÓN	61
H. CROMATOGRAMAS DE EXTRACTO ETANÓLICO	62
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
A. SOPORTE.....	73
B. PRODUCTOS DE REACCIÓN	74
C. SOLVENTES PRELIMINARES.....	78
D. SERIE ISOPROPANOL-ÁCIDO ACÉTICO	80
E. SERIE ACETONA-NAOH.....	80
F. PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL EXTRACTO	81

G. CROMATOGRAMAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO.....	81
IX. CONCLUSIONES	82
X. LITERATURA CITADA	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. LOS PUNTOS ROJOS INDICAN LA DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LOS BROTES DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS. WOODS HOLE OCEANOGRAPHIC INSTITUTION NOAA- 2006.	4
FIGURA 2. SIMILITUD MOLECULAR POR LA PRESENCIA DE UN ANILLO DE PROLINA EN A) ÁCIDO DOMOICO, B) ÁCIDO KAINICO Y C). PROLINA. IMÁGENES DE PUBCHEM NCBI.	13
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN MÉXICO. (INAPESCA 2012).....	18
FIGURA 4. EQUIPO PARA ASPERSIÓN DE FASE ESTACIONARIA EN PLACAS DE VIDRIO Y LÁMINAS DE PET.	24
FIGURA 5. LAMINA DE PET CON CELULOSA MICROCRISTALINA PREPARADA EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA MARINA.....	24
FIGURA 6. LAMINA DE PET CON GEL DE SÍLICE G-60.	25
FIGURA 7. A) ASPECTO TRANSLÚCIDO DE LAS TIRAS DE PET CON CELULOSA MICROCRISTALINA PRODUCIDA EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA MARINA.	30
FIGURA 8. MUESTRA LAS TONALIDADES DE AMARILLO DE LOS CROMÓFOROS QUE SE PRODUCEN AL REACCIONAR ÁCIDO DOMOICO, ÁCIDO KAÍNICO Y PROLINA CON EL REACTIVO N.	33

FIGURA 9. Λ_{MAX} Y TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN T_E DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO DOMOICO A 20 MG/L, ABSORBANCIAS TOMADOS CADA 5 MINUTOS ENTRE 400 Y 600 NM.	35
FIGURA 10. Λ_{MAX} Y TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN T_E DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO KÁINICO A 20 MG/L, ABSORBANCIAS TOMADOS CADA 5 MINUTOS ENTRE 400 Y 600 NM.	36
FIGURA 11. Λ_{MAX} Y TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN T_E DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + PROLINA A 20 MG/L, ABSORBANCIAS TOMADOS CADA 5 MINUTOS ENTRE 400 Y 600 NM.	37
FIGURA 12. VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA AL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN $T_E = 95$ MIN Y $\Lambda_{MAX} = 413$ NM DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO DOMOICO A 5, 10, 20, 30 Y 40 MG/L. BARRIDOS ENTRE 400 Y 600 NM CADA 5 MINUTOS.	38
FIGURA 13. VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA AL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN $T_E = 240$ MIN Y $\Lambda_{MAX} = 413$ NM DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO KÁINICO A 5, 10, 20, 30 Y 40 MG/L. BARRIDOS ENTRE 400 Y 600 NM CADA 5 MINUTOS.	39
FIGURA 14. VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA AL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN $T_E = 50$ MIN Y $\Lambda_{MAX} < 400$ NM DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + PROLINA A 5, 10, 20, 30 Y 40 MG/L. BARRIDOS ENTRE 400 Y 600 NM CADA 5 MINUTOS.	40
FIGURA 15. MUESTRA LA VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO DOMOICO RESPECTO DE LA MOLARIDAD DE ÁCIDO	

DOMOICO, LA ECUACIÓN CORRESPONDIENTE Y EL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R^2 .	41
FIGURA 16. MUESTRA LA VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO KAÍNICO RESPECTO DE LA MOLARIDAD DE ÁCIDO KAÍNICO, LA ECUACIÓN CORRESPONDIENTE Y EL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R^2 .	42
FIGURA 17. MUESTRA LA VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N + PROLINA RESPECTO DE LA MOLARIDAD DE PROLINA, LA ECUACIÓN CORRESPONDIENTE Y EL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R^2 .	43
FIGURA 18. CURVA DE ABSORBANCIA CONTRA TIEMPO DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO DOMOICO A $\lambda_{MAX} = 413$ NM.	45
FIGURA 19. CURVA DE ABSORBANCIA CONTRA TIEMPO DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO KAÍNICO A $\lambda_{MAX} = 413$ NM.	47
FIGURA 20. CURVA DE ABSORBANCIA CONTRA TIEMPO DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N +PROLINA A $\lambda_{MAX} = 400$ NM.	48
FIGURA 21. LINEALIDAD DE INTERVALO PARA LAS ABSORBANCIAS DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO DOMOICO.	49
FIGURA 22. LINEALIDAD DE INTERVALO PARA LAS ABSORBANCIAS DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO KAÍNICO.	49
FIGURA 23. LINEALIDAD DE INTERVALO PARA LAS ABSORBANCIAS DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N +PROLINA.	50

FIGURA 24. ASPECTO TRANSLÚCIDO DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS EN TUBOS DE VIDRIO CON EL USO DE TIRAS PET CON CELULOSA MICROCRISTALINA PRODUCIDA EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA.....	51
FIGURA 25. SE MUESTRA UN MONITOREO DE PRODUCTOS DE REACCIÓN EN EL QUE SE USA AA 3% E ISP 1 : 1 COMO FASE MÓVIL.....	52
FIGURA 26. SE MUESTRA UN MONITOREO DE PRODUCTOS DE REACCIÓN EN EL QUE SE USA AA 3% / ISP 2x1 COMO FASE MÓVIL.	53
FIGURA 27. SE MUESTRA UN MONITOREO DE PRODUCTOS DE REACCIÓN EN EL QUE SE USA AA 3% / ISP 3x1 COMO FASE MÓVIL.	54
FIGURA 28. SE MUESTRA UN MONITOREO DE PRODUCTOS DE REACCIÓN EN EL QUE SE USA AA 3% / ISP 4x1 COMO FASE MÓVIL.	55
FIGURA 29. CROMATOGRAMAS DE PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL REACTIVO N CON ÁCIDO DOMOICO D, ÁCIDO KAÍNICO K, PROLINA P, UN MEZCLA M DE ÁCIDO DOMOICO, ÁCIDO KAÍNICO Y PROLINA. EN EXTREMO DERECHO DE CADA FOTOGRAFÍA TAMBIÉN SE MUESTRA UN CROMATOGRAMA CON EL REACTIVO N SIN REACCIÓN. SE USARON DIFERENTES PROPORCIONES DE ACETONA E NaOH.....	60
FIGURA 30. ASPECTO DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL REACTIVO N AL 1% CON ÁCIDO DOMOICO.....	61
FIGURA 31. TRES JUEGOS DE CROMATOGRAMAS DE EXTRACTO ETANÓLICO DE MEJILLÓN. SE MUESTRAN BAJO ILUMINACIÓN CON LUZ VISIBLE (IZQUIERDA) Y UN JUEGO A LUZ ULTRAVIOLETA UV (DERECHA). CROMATOGRAMA DE PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL REACTIVO N AL 1% CON ÁCIDO DOMOICO.....	62

FIGURA 32. MECANISMO DE REACCIÓN Y PRODUCTO DEL REACTIVO N + PROLINA EN MEDIO BÁSICO. ADAPTACIÓN DE LA FIG19.3 EN EXPERIMENTOS DE QUÍMICA ORGÁNICA DE ANDERSON GUARNIZO FRANCO, PEDRO NEL MARTÍNEZ YEPES....	77
FIGURA 33. FIGURA 40. MECANISMO DE REACCIÓN Y ESTRUCTURA MOLECULAR PROPUESTO PARA LA REACCIÓN DEL REACTIVO N + ÁCIDO KAÍNICO.	77
FIGURA 34. MECANISMO DE REACCIÓN Y ESTRUCTURA MOLECULAR PROPUESTO PARA LA REACCIÓN DEL REACTIVO N Y ÁCIDO DOMOICO.	78

LISTA DE TABLAS

TABLA I. ORGANISMOS PRODUCTORES, BIOACUMULADORES Y VECTORES DE D.	11
TABLA II. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO.	14
TABLA III. RESULTADOS DE PRUEBAS DE ADSORCIÓN Y FRACTURA DE GEL DE SÍLICE Y CELULOSA MICROCRISTALINA APLICADA CON VARILLA EN PLACAS DE VIDRIO Y TIRAS DE PET	29
TABLA IV. RESULTADOS DE PRUEBAS DE ADSORCIÓN Y FRACTURA DE GEL DE SÍLICE Y CELULOSA MICROCRISTALINA APLICADA CON AERÓGRAFO EN PLACAS DE VIDRIO Y TIRAS DE PET	31
TABLA V. PARÁMETROS ESPECROFOTOMÉTRICOS DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO DOMOICO, EL REACTIVO N+ÁCIDO KAÍNICO Y EL REACTIVO N +PROLINA	33
TABLA VI. COEFICIENTES DE EXTINCIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO DOMOICO	41

TABLA VII. COEFICIENTES DE EXTINCIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO	
N+ÁCIDO KAÍNICO	42
TABLA VIII. COEFICIENTES DE EXTINCIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DEL REACTIVO	
N +PROLINA	43
TABLA IX. ABSORBANCIAS A TIEMPOS DE LA REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO	
DOMOICO A $\lambda_{MAX}=413$ NM	44
TABLA X. ABSORBANCIAS A TIEMPOS DE LA REACCIÓN DEL REACTIVO N+ÁCIDO KAÍNICO	
A $\lambda_{MAX}=413$ NM.	46
TABLA XI. ABSORBANCIAS A TIEMPOS DE LA REACCIÓN DEL REACTIVO N+PROLINA A	
$\lambda_{MAX}=400$ NM.	47

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas emergentes y de considerable impacto en la salud pública y las economías regional e internacional, es la aparición de mareas rojas. Este fenómeno que también se conoce como floración algal nociva (FAN) consiste en una marcada proliferación planctónica que ocurre predominantemente en latitudes marítimas ecuatoriales, tropicales, subárticas y superantárticas (Fig. 1); durante el verano correspondiente a cada hemisferio.

El trabajo de Anderson *et al.*, 2000; estima que la frecuencia de las FAN en el mundo va en aumento y que la eutroficación es considerada como una gran amenaza a la funcionalidad de los ecosistemas costeros; sin embargo no existe un consenso claro en lo referente a las causas definitivas de las FAN.

Durante las FAN un pequeño porcentaje de especies de algas diatomeas pueden acumular o producir diversas neurotoxinas, capaces de difundirse a través de la cadena trófica, causando la muerte de múltiples especies de peces, aves, mamíferos marinos y humanos (Tabla I).

Actualmente los países cuyas economías costeras se ven afectadas por este fenómeno, concentran su atención en la prevención e implementan programas de monitoreo para emitir boletines que anuncian brotes en curso o

brotes potenciales de FAN; por lo que la detección temprana de neurotoxinas en tejidos de moluscos y crustáceos es hasta ahora la estrategia más aplicada.

Normalmente para los países en desarrollo, las tecnologías utilizadas para el monitoreo de las FAN son onerosas, alejadas de las áreas de producción o pesca y carecen de sentido práctico, mientras que los aparatos y equipos se producen en el extranjero; incrementándose los costos de operación y mantenimiento por cargas arancelarias (Tabla II).

Entre las neurotoxinas de mayor relevancia por su distribución y frecuencia y que se producen en las FAN, se encuentra el D (Fig. 3). El D (Fig. 2A) es una potente neurotoxina que causa una intoxicación amnésica en humanos y es responsable de un número considerable de muertes de peces, bivalvos y crustáceos (Tabla I). Entre las especies que se ven afectadas por el D se encuentra un buen número de ellas que son de interés comercial y que se destinan al consumo humano, por lo que el riesgo de exposición se incrementa durante las FAN de especies productoras de D.

El caso de mayor difusión y en el que se identificó por primera vez al D como el agente causal de 3 muertes y más de 100 personas enfermas, fue el de la intoxicación de 1987, que se debió a la ingesta de mejillones contaminados con D en la Isla Prince Williams, Canadá. A partir de este incidente numerosos

estudios e investigaciones se han realizado para tratar de prevenir o al menos alertar al público en general, de la presencia de FAN productoras de D.

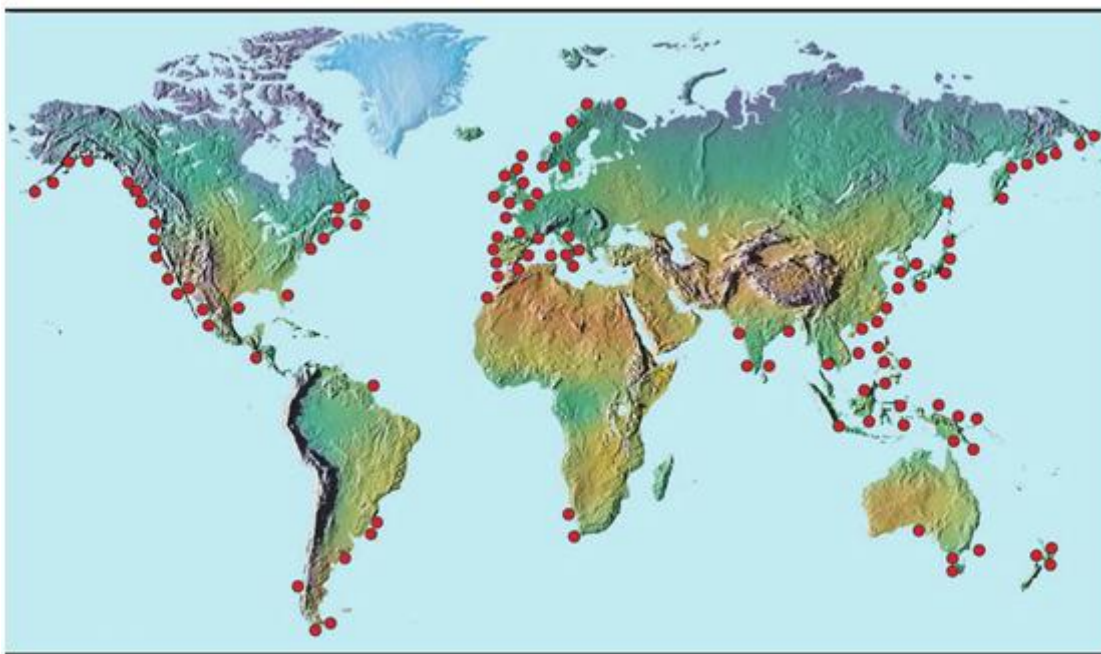


Figura 1. Los puntos rojos indican la distribución mundial de los brotes de floraciones algales nocivas. Woods Hole Oceanographic Institution NOAA-2006.

II. ANTECEDENTES

A. Causas de las FAN

La FAN es un fenómeno natural, con una serie de factores que aún no se han establecido en su totalidad. En general, entre los factores que se han asociado a los brotes del fenómeno se encuentran el aumento de la temperatura marina, cambios repentinos en la salinidad y el aumento en la

concentración de nutrientes al momento del brote. Es casi seguro que el cambio climático influya de alguna manera sobre la dinámica de las FAN; dado que muchos procesos críticos que gobiernan la dinámica de este fenómeno tales como la temperatura, estratificación, surgencias, corrientes oceánicas y el enriquecimiento de nutrientes por aporte de agua fresca y aguas derivadas de tierra; son influenciados por el clima (Edwards *et al.*, 2006).

Las descargas de desechos agrícolas y humanos, actualmente se investigan para establecer una probable asociación con los brotes de FAN. Si bien es cierto que los brotes de FAN constituyen un fenómeno natural en ecosistemas costeros, se piensa que la actividad humana contribuye al incremento de la frecuencia de brotes de algunas FAN (GEOHAB 2006). A pesar de que no todas las FAN ocurren en ambientes con alta concentración de nutrientes, el aumento de cargas de nutrientes se ha reconocido como un probable factor que contribuye a la frecuencia de las FAN (Heisler *et al.*, 2008). Otros cambios antropogénicos que podrían ayudar al desarrollo de ciertas FAN incluyen cambios en la carga de nutrientes (Heisler *et al.*, 2008), la alteración de la cadena trófica por la pesca exhaustiva (Jackson *et al.*, 2001), la introducción de especies no nativas (Hallegraeff & Bolch 1992; Vanderploeg *et al.*, 2001) y modificaciones en el flujo de aguas (Ferreira *et al.*, 2005).

El papel interactivo del cambio climático con otros factores que influyen sobre la frecuencia y la severidad de las FAN es un tema de investigación que actualmente se encuentra en sus primeras etapas. Las causas específicas de las FAN son complejas y aún no se comprenden del todo. Suelen variar de acuerdo a las especies dominantes en los brotes y la ubicación geográfica donde éstos ocurren. En general, las especies de algas asociadas a las FAN proliferan cuando las condiciones ambientales como la afluencia de nutrientes, disponibilidad de la luz solar, temperatura y salinidad son óptimas para el crecimiento celular. Otros procesos biológicos y físicos como la migración vertical, los hábitos de alimentación, infecciones virales, el parasitismo y el transporte; determinan si el crecimiento celular resulta en una acumulación de biomasa (Lopez *et al.*, 2008).

B. Consecuencias de las FAN

Las FAN tienen consecuencias en tres ámbitos: el ambiental, el de la salud humana y el socioeconómico.

A nivel ambiental, tienen principalmente tres efectos que representan presiones sobre los ecosistemas y hábitats de los organismos filtradores y depredadores marinos. Afectando:

- 1) la bioacumulación de toxinas en los organismos filtradores que al ser consumidos por sus depredadores; les produce la muerte por intoxicación
- 2) la demanda biológica de oxígeno que se incrementa exponencialmente al aumentar la población de microalgas y dinoflagelados desde unos miles de células por litro a millones por litro; produciendo una hipoxia local
- 3) la concentración de microalgas presentes en las FAN que bloquean las branquias de especies filtradoras.

En lo referente a la salud humana, produce enfermedades mediante potentes biotoxinas que al ser ingeridas en los alimentos de origen marino o al ser inhaladas de aerosoles marinos resultan en envenenamientos conocidos como síndromes de intoxicación por biotoxinas marinas. Actualmente se conocen más de una docena de síndromes producidos por intoxicaciones relacionadas con las toxinas de las FAN (WHOI 2007). Los síndromes que tiene mayor importancia por su frecuencia, intensidad y distribución geográfica son:

- 1) la intoxicación causada por ciguatoxina o maitotoxina, conocida como CFP por consumir productos marinos contaminados
- 2) la Intoxicación paralítica causada por saxitoxinas, conocida como PSP, por consumir moluscos o crustáceos contaminados

- 3) la intoxicación amnésica causada por el D, conocida como ASP, por consumir moluscos o crustáceos contaminados
- 4) la intoxicación diarreica causada por el ácido okadaico, conocida como DSP, por consumir moluscos o crustáceos contaminados
- 5) la intoxicación neurotóxica causada por brevetoxinas, conocida como NSP, por consumir productos marinos contaminados o aspirar aerosol marino contaminado

En cada uno de los síndromes se han identificado, aislado y estudiado ampliamente los agentes etiológicos correspondientes y se han clasificado en función de sus mecanismos de acción neurotóxica (WHOI 2007). De igual manera se han identificado los organismos productores y acumuladores de las biotoxinas responsables de los diversos síndromes. En el mecanismo de acción invariablemente se observa una actividad agonista del principio activo sobre alguno(s) de los neuroreceptores específicos de glutamato, ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), kainato, N-metil-D-aspartato (NMDA), canales iónicos de Na^+ y los metabotrópicos que se encuentran asociados a las proteínas G de la membrana celular (Botana 2008). Algunas neurotoxinas actualmente sirven como modelo inductor de crisis atáxicas o epileptogénicas en animales de laboratorio (Dickey *et al.*, 1992) en los que se estudian fármacos potenciales para el tratamiento de enfermedades cardiotónicas y crónico-degenerativas; mientras que otras neurotoxinas se usan

como ascaricidas o antihelmínticos en el tratamiento de parasitosis (Takemoto & Daigo 1958).

A nivel socioeconómico, las FAN afectan negativamente la producción de alimentos de origen marino, aumenta los costos de atención a la salud pública, implica costos de remediación ambiental y desalienta el turismo por periodos de tiempo incierto.

C. Ácido domoico, una toxina que se producen en las FAN

En 1987 en la isla de Prince Edward Canadá, ocurrió un evento de FAN en el que murieron tres personas y enfermaron 153 debido al D hallado en mejillones (Bates *et al.*, 1988). Otro incidente de 1998 en California en el que se identificó el D ocasionó una cardiomiopatía degenerativa concurrente en el león marino de California, *Zalophus californianus* (Zabka *et al.*, 2009). En México, en los últimos 20 años se tienen registros de FAN en las que se ha demostrado que especies productoras de D, han sido responsables de mortandades de peces, moluscos, crustáceos, aves y mamíferos en por lo menos 17 veces en el Pacífico Norte y Golfo de California (COFEPRIS 2013).

Tras el incidente de intoxicación por moluscos de 1987 en la Isla de Prince Edward Canadá, se estableció que el agente causal de la intoxicación era el D

(Bates *et al.*, 1989). El contenido de D en el tejido de mejillones contaminados se cuantificó entre 520 y 1280 µg/g (mg/kg) (Todd 1993). Debido a la masa de moluscos consumidos por cada individuo, se calculó que al consumir los moluscos recibieron dosis de entre 0.2 y 4.1 mg/kg (Todd 1993). En seres humanos adultos, el D no produce síntomas de ASP, sino hasta recibir una dosis igual o mayor a 0.9 mg/kg de peso corporal tras la ingesta de mariscos contaminados (Lefebvre & Robertson 2010). En los EE.UU. la FDA (2010) o “Food and Drug Administration” (Administración de Fármacos y Alimentos, por sus siglas en inglés) permite la pesca y comercialización de especies marinas con un contenido máximo de 20 mg/kg; pero hace una excepción al permitir un máximo 30 mg/kg en el hepatopáncreas o vísceras de cangrejos *Cancer magister*. De manera equivalente la Norma Oficial Mexicana: NOM-242-SSA1-2005 establece un límite máximo de 20 mg/kg en carne de productos marinos en general. A la fecha no se conocen antídotos para el tratamiento del síndrome ASP (Alvarez-Falconí 2009).

D. Especies que producen ácido domoico

En la cadena trófica que involucra al D se han identificado organismos productores, bioacumuladores y vectores (Tabla I).

Tabla I. Organismos productores, bioacumuladores y vectores de D.

Función	Organismo		referencia
Organismos productores	macroalgas	<i>Alsidium corallinum</i>	(Homer & Postel 1993)
		<i>Chondria armata</i>	
		<i>Chondria baileyana</i>	
	Algas diatomeas	<i>Amphora coffaeiformis</i>	(FAO 2004a)
		<i>Nitzschia navis-varingica</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia turgidula</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia. Multiseries</i>	
		<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	
Organismos bioacumuladores y vectores	mejillones	<i>Mytilus edulis</i>	(Martin et al., 1993; Altwein et al., 1995; Douglas et al., 1997)
		<i>Mytilus californianus</i>	
	almejas	<i>Saxidomus giganteus</i>	
		<i>Siliqua patula</i>	
		<i>Ensis siliqua Linnaeus</i>	
		<i>Ruditapes decussata</i>	
		<i>Ostrea edulis Linnaeus</i>	
	escalopas	<i>Pecten maximus</i>	
		<i>Pecten maximus Linnaeus</i>	
		<i>Chlamys opercularis Linnaeus</i>	
	cangrejos	<i>Cancer magister</i>	(Bargu et al., 2002)
		<i>Polibius henslowii</i>	
	anchoas	<i>Engraulis mordax Girard</i>	
	Krill	<i>Euphausia pacifica</i>	
	peces	<i>Scomber japonicus</i>	(Sierra-Beltrán et al., 1998)
		<i>Sardinops sagax</i>	(Cortés-Altamirano et al., 2004)

E. Aspectos moleculares del ácido domoico

Se han caracterizado 8 isómeros tóxicos del D (Clayden *et al.*, 2005) cuyas abundancias no exceden el 5% respecto del D que se presenta hasta en un 90% en extractos contaminados de *Mytilus edulis* (Wright *et al.*, 1990).

El D es soluble en agua y soluciones diluidas de ácidos y bases, pero insoluble en solventes no polares, en los que precipita formando cristales en forma de agujas blancas o transparentes. Las soluciones diluidas de D son estables hasta por un año en una solución de acetonitrilo en agua 1:9 a -12°C y en alimentos usados como patrones de referencia a 4°C por un año (Alvarez-Falconí 2009).

La estructura molecular de las neurotoxinas: D y K, así como la del aminoácido proteogénico P, poseen un anillo de pirrolidina (Tasker *et al.*, 2000) (Fig. 2).

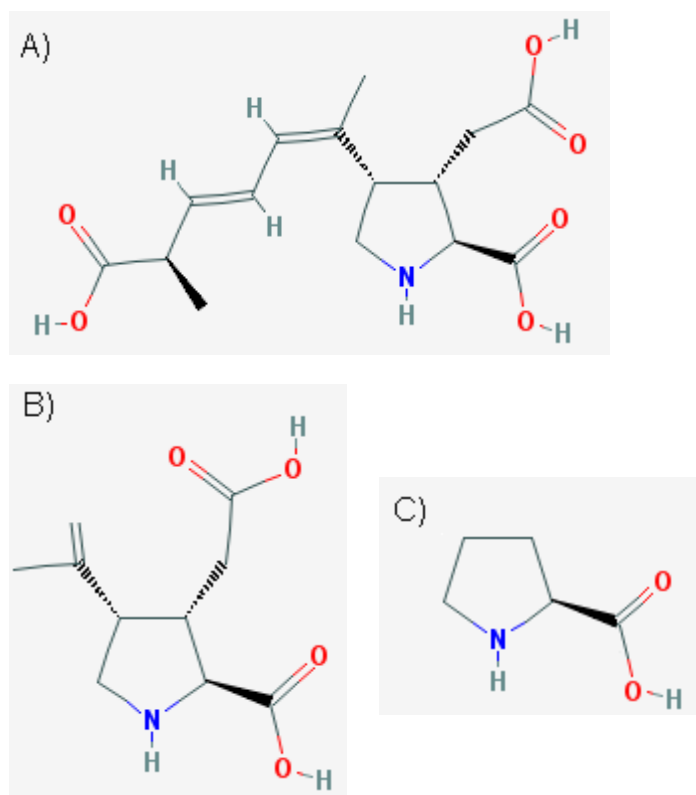


Figura 2. Similitud molecular por la presencia de un anillo de prolina en A) ácido domoico, B) ácido kainico y C). prolina. Imágenes de PubChem NCBI.

F. Tecnologías aplicadas a la detección de ácido domoico

Actualmente se dispone de diversos métodos analíticos para la detección y cuantificación de D y sus isómeros. A continuación se presenta una tabla de métodos y ensayos que a la fecha se vienen aplicando para este fin (Tabla II).

Tabla II. Métodos de detección y cuantificación de ácido domoico.

Bioensayos	
	<i>in vivo</i> : bioensayo en ratón
	<i>in vitro</i> : ensayos de enlace con receptores (RBA)
	<i>in vitro</i> : ensayo con cortes hipocampales
Ensayos bioquímicos	Inmunoensayos.
	ELISA.
	Biosensores
Ensayos químicos	Cromatografía de capa fina (TLC).
	Cromatografía de fase líquida de alto desempeño acoplada a espectrómetro ultravioleta (HPLC-UV).
	Cromatografía de fase líquida de ultra-desempeño acoplada a espectrómetro de masas en serie (UPLC/MS/MS).
	Cromatografía líquida (LC).
Otros ensayos	Electroforesis de aminoácidos en geles.
	Electroforesis capilar (CE).
	Espectrometría de masas (MS).

G. Análisis de ventajas y desventajas de las tecnologías actuales para la detección de ácido domoico

El método de Cromatografía de fase líquida de alto desempeño acoplada a detección ultravioleta (HPLC-UV) para la detección y cuantificación de D es el más utilizados (CEN/TC275 2008); pero sólo uno dellos ha sido validado por la “Association of Official Analytical Chemists” o AOAC y estandarizado por el Comité Europeo de Normalización (CEN) bajo el título de Método 14176 (FAO 2004b). Además, un método de ELISA ha sido validado por la AOAC bajo el título de Método 2006.02 (EFSA 2009) y se ha autorizado oficialmente para su uso en los EE.UU. sólo con propósitos de detección. Estos métodos presentan

límites de detección lo suficientemente bajos como para detectar adecuadamente el D a concentraciones de 4.5 mg/kg en carne de crustáceos y moluscos. La evidencia disponible sugiere que la cromatografía de fase líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), particularmente usando ionización por electronebulización en serie, puede ser una valiosa herramienta para una determinación rápida y selectiva de D y sus isómeros en extractos crudos (de la Iglesia *et al.*, 2008). Otros métodos químicos se han desarrollado pero rara vez se utilizan porque no han sido validados por estudios colaborativos de laboratorios certificados por la AOAC y el CEN.

El método de bioensayo en ratón se sigue utilizando en la Unión Europea para detectar toxinas marinas excepto al D. El bioensayo en ratón detecta D cuando se le administran dosis de 35 mg/kg o mayores (Iverson *et al.*, 1990). Por un lado, presenta la ventaja de poder detectar al menos las 13 biotoxinas conocidas en las que basa la estrategia de monitoreo la Unión Europea. No obstante, su uso implica problemas de especificidad, sensibilidad y éticos, ya que se somete a los animales de laboratorio a prolongados periodos de sufrimiento físico hasta que se verifica la muerte. Además es poco específico y requiere hasta 72 horas para completar los resultados finales de los análisis. Este instrumento de vigilancia es útil para la protección del consumidor ya que detecta sin dificultad la concentración máxima permitida en mayoría las toxinas en tejidos comestibles de moluscos y crustáceos.

El anuncio del lanzamiento del proyecto ALARMTOX el 15 de julio de 2009, en la Unión Europea por parte del programa INTERREG IVB - SUDOE (Sudoeste Europeo) planteó desarrollar una tecnología que diera respuesta a la necesidad de herramientas más rápidas, específicas, sensibles y rentables, basadas en biosensores para la detección de biotoxinas de medios acuáticos (IRTA *et al.*, 2009). Dichos biosensores estarían fundamentados en la capacidad inhibitoria de las biotoxinas sobre enzimas diseñadas mediante ingeniería genética. La concentración de biotoxinas podrían entonces cuantificarse mediante métodos colorimétricos y electroquímicos (IRTA *et al.*, 2009).

H. Necesidades de desarrollo de nuevas tecnologías para la detección de toxinas

Existen diversas tecnologías para la detección y cuantificación de toxinas marinas en la actualidad, pero su uso rutinario en el campo donde se originan las muestras se ve limitado por sus costos de operación. Además, todas ellas requieren pagos de aranceles por concepto de importación al momento de entrar a México. Existe una clara necesidad de tecnologías mexicanas de bajo costo pero con el poder cualitativo y cuantitativo que se requiere para ser utilizadas rutinariamente en el campo en el que se originan las muestras. Se

requieren pruebas prácticas que determinen con cierto grado de confiabilidad la presencia y concentración de neurotoxinas marinas, en particular del D, ya que los organismos que lo producen (*Pseudonitzschia* spp.) se han identificado en una mayor extensión geográfica dentro del Pacífico Norte Mexicano y el Golfo de California; Cabo San Lucas, B. C. S., Alto Golfo de California, Bahía Todos Santos, B. C. y Bahía de La Paz, B. C. S. (Band-Schmidt *et al.*, 2011).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de D como resultado de las floraciones algales nocivas en moluscos comerciales de Baja California y del Pacífico mexicano; impacta los ámbitos económico, pesquero, acuícola, ecológico y el de la salud humana (Band-Schmidt *et al.*, 2011). Tanto la distribución geográfica de los florecimientos algales nocivos en México como su agente causal, se pueden apreciar en la Figura 3., en la que podemos observar que las especies del género *Pseudonitzschia*, productoras de D causante del síndrome ASP, presentan la mayor cobertura costera en la península de Baja California. Es por esta razón que estudios más amplios relacionados con la detección y cuantificación de D y otras neurotoxinas marinas son relevantes y dado que entre las actividades económicas más importantes en nuestro estado se encuentran la pesca, la acuicultura y el turismo, un monitoreo rutinario para la detección de D se hace necesario.



Figura 3. Distribución geográfica de floraciones algales nocivas en México. (INAPESCA 2012).

El impacto económico anual que producen las FAN en el mundo se estima en 4.5 mil millones de USD, en los EE.UU. es de \$ 82 millones de USD (Hoagland *et al.*, 2002), en algunos casos las pérdidas económicas han llegado a ser de hasta \$300,000. USD por día (Llewellyn *et al.*, 2006). En México no se tienen estadísticas detalladas que revelen las pérdidas económicas totales por FAN. Sin embargo, se suelen hacer estimaciones locales cuando se presenta alguna floración de algas nocivas. Por ejemplo, de agosto a septiembre de 2007, entre Punta Abreojos y La Bocana, B.C.S., ocurrió una floración algal nociva del dinoflagelado *Akashiwo sanguinea*; fueron halladas en la costa

aproximadamente 100,000 langostas (*Panulirus interruptus*) con una masa estimada en más de 45 toneladas (Gómez-Tagle 2007); la mayoría dellas eran hembras ovíferas. En el mismo evento, aproximadamente 2.5 toneladas de abulones (*Haliotis* spp.) murieron, así como ostiones cultivados (*Crassostrea* spp.) y diversas especies de caracoles y peces. Este evento resultó en una pérdida económica calculada en \$1,784,616 USD. (Núñez-Vázquez *et al.*, 2011). Estos datos sugieren acciones de prevención que nos lleven a una mejor utilización de los recursos marinos.

Mientras que en el extranjero se desarrollan nuevas tecnologías, en México se pueden plantear tecnologías alternativas que permitan mantener la competitividad en el ámbito pesquero y acuícola. Por ello el presente trabajo plantea el siguiente objetivo.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo de trabajo

Desarrollar un prototipo de prueba *in situ* basado en cromatografía de capa fina para la detección y cuantificación de ácido domoico (D) en extractos de moluscos de interés comercial, cuya sensibilidad y especificidad cumplan con las normas internacionales.

B. Objetivos específicos

- 1) Construir una plataforma cromatográfica portátil y de fácil manejo para la detección de D, en muestras de referencia.
- 2) Lograr que la plataforma cromatográfica construida detecte específicamente el producto de reacción de D con un agente químico (N).
- 3) Lograr que la plataforma cromatográfica construida detecte el producto de reacción de D con N en concentraciones de 20 mg/L o mayores en extractos de mejillones.

V. HIPÓTESIS

Un dispositivo basado en una plataforma cromatográfica detecta específicamente D en concentraciones de 20 mg/L o mayores en tejidos de moluscos, de acuerdo con las normas internacionales.

VI. METODOLOGÍA

A. Diseño experimental

El modelo de prototipo pretende demostrar en principio, que es factible realizar lecturas de absorbancia de las manchas aisladas de los productos de

reacción que se presentan en la trayectoria del desplazamiento cromatográfico. El modelo de prototipo se sometió a una serie de evaluaciones en las que se determinó el desempeño analítico y estadístico. En cada línea de desarrollo se experimentó con materiales y modelos con los que se buscó cumplir con los requisitos de diseño para el prototipo.

Las fases realizadas en esta etapa fueron:

- 1) Desarrollo del soporte
- 2) Desarrollo de la fase estacionaria
- 3) Caracterización de la reacción química

B. Desarrollo del soporte

Se montaron varias bases para aplicar las fases estacionarias. Placas de vidrio cromatográfico de 75 X 25 mm para depositar gel de sílice G-60 como fase estacionaria. De la misma manera, láminas de polietilentereftalato (PET) usadas comúnmente para la impresión de transparencias se utilizaron para soportar una fase estacionaria de celulosa microcristalina de dos tipos, una de Aldrich 31,069-7 y otra celulosa microcristalina preparada en el laboratorio de Farmacología Marina.

C. Desarrollo de la fase estacionaria

Se montaron placas de vidrio y de PET anteriormente descritas con los siguientes materiales de soporte para ser probados:

- 1) Gel de sílice Sigma G-60. Se prepararon mezclas en proporciones de 4:1, 3:1, 2:1 y 1:1 con yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y fueron extendidas con varillas de vidrio .
- 2) Celulosa microcristalina. Celulosa microcristalina de Aldrich 31,069-7 y celulosa microcristalina preparada en el Laboratorio de Farmacología Marina en agua o etanol, ambas aplicadas sobre las láminas de PET anteriormente descritas, mediante aspersión con aerógrafo o por extensión con varilla de vidrio. Las láminas de PET con la fase estacionaria fueron cortadas en tiras de 0.8 x 8 cm.

La preparación de la celulosa microcristalina en el Laboratorio de Farmacología Marina (LFM) se realizó mediante hidrólisis de algodón quirúrgico. Trozos de algodón desmadejado se sometieron a una hidrólisis ácida con ácido clorhídrico. La hidrólisis fue catalizada por calentamiento en parrilla a una temperatura de 90 °C bajo agitación constante con agitador magnético. La mezcla resultante de la hidrólisis fue filtrada con papel filtro Whatman No. 42 bajo un sistema convencional de vacío. Se realizaron lavados con agua destilada hasta lograr la neutralidad del filtrado; revisando el pH final con papel pH (HidronP controls Micro Essential Laboratory). El residuo obtenido de la filtración al vacío se secó en horno de calor seco a 65 °C. El producto seco de la hidrólisis se trituyó en mortero de porcelana hasta lograr la consistencia de un polvo fino el cual fue tamizado para su almacenamiento. Se

prepararon suspensiones de celulosa microcristalina de Sigma y del LFM a diferentes concentraciones en dos disolventes para realizar las aplicaciones en vidrio y láminas de PET. Las suspensiones se calentaron bajo agitación magnética hasta 55 °C y se aplicaron sobre los soportes a una temperatura de 47°C. Se realizaron las aplicaciones mediante varilla de vidrio y aspersión por aerógrafo. El fraguado se realizó a temperatura ambiente y se cortaron las tiras de PET para ser activadas a 65 °C antes de su uso.

La adsorción se evaluó mediante el tacto directo a la superficie de la fase estacionaria ya fraguada. La resistencia a la fractura se evaluó al tacto directo para las placas de vidrio y a la flexión para las tiras de PET.



Figura 4. Equipo para aspersión de fase estacionaria en placas de vidrio y láminas de PET.



Figura 5. Lamina de PET con celulosa microcristalina preparada en el Laboratorio de Farmacología Marina.



Figura 6. Lamina de PET con gel de sílice.

D. Fase móv

Se realizaron corridas cromatográficas en una serie de solventes cuya polaridad se fue variando paulatinamente. Posteriormente se hicieron mezclas de solventes para buscar la separación y una mejor resolución de las manchas cromatográficas.

Los solventes que se usaron fueron, agua destilada, metanol (Sigma M3641), etanol (Mallinkrodt 7019), acetona (Sigma-Aldrich 1545 48), diclorometano (Sigma 15,479-2), isopropanol (Mallinkrodt 3032), éter anhidro

(Sigma 346136), hexano (J.T. Baker Chemicals 3-9262) y ácido acético glacial (Spectrum A1010).

E. Caracterización de la reacción química

La calibración del espectrofotómetro se realizó mediante la rutina de autocalibración del sistema Helios alpha 9499 230 4581 y el software Vision Pro 2002-2005 V.3.0. El sistema fue llevado a la línea base cero mediante una solución del reactivo N en etanol, misma que se utilizó como reactivo en las reacciones con P, K y D. Al reactivo de N usado como blanco de calibración se le agregó un volumen de etanol igual al volumen de solución estándar agregado en cada reacción. Todas las diluciones que se prepararon se hicieron con etanol (Alcohol Absoluto Mallinkrodt 7019).

Se montaron reacciones simultáneas de N con P, K y D en tubos cónicos de 1.5 mL utilizando 500 μ L del reactivo N y 500 μ L de la solución estándar correspondiente y se tomaron lecturas de absorbancia cada 5 minutos. Los parámetros del espectrofotómetro se fijaron en un método de barrido de absorbancias a un intervalo de 400 a 600 nm, con un ancho de banda de 1.5 nm, un cambio de lámpara de Xe (xenón) a una de W (tungsteno).

Visualización de productos de reacción. Se realizó mediante una lámpara UV (Mineralight Model UVGL-58) para cromatografía de capa fina, que emite radiación a 254 y 366 nm.

F. Cromatografía

Como cámara cromatográfica se utilizaron tubos de plástico de fondo cónico de 15 mL con tapa y tubos de vidrio de 7.0 mL con tapa. Como soporte cromatográfico se usaron tiras de PET con una fase estacionaria de celulosa microcristalina preparada en el LFM para el seguimiento de las relaciones frontales de los productos de reacción.

VII. RESULTADOS

A. Desarrollo del soporte y fase estacionaria

De los materiales disponibles comercialmente se hizo una eliminación con base en las características de su transparencia. La mayoría de los soportes para fases estacionarias no son transparentes; por lo que materiales como aluminio y plásticos blancos fueron descartados como candidatos para un modelo de prototipo. Por otro lado las fases estacionarias suelen ser opacas como el gel de sílice, el óxido de aluminio o alúmina, la tierra silíceo ó kieselguhr, la celulosa (nativa o micro-cristalina) y las

poliamidas. Buscando cierto grado de translucidez en el prototipo; decidimos hacer una serie de preparaciones de mezclas en distintas proporciones de solvente y fase estacionaria, que nos permitiera depositar una capa muy fina sobre un soporte inerte y transparente. Además por razones de costo y disponibilidad, decidimos trabajar con gel de sílice y celulosa microcristalina.

Se evaluó la adsorción mediante el tacto directo a la superficie de la fase estacionaria ya fraguada y la resistencia a la fractura se evaluó al tacto directo para las placas de vidrio y la flexión para las tiras de PET (Fig. 7). Los resultados de esta evaluaciones de detallan en las Tablas III y IV.

Tabla III. Resultados de pruebas de adsorción y fractura de gel de sílice y celulosa microcristalina aplicada con varilla en placas de vidrio y tiras de PET.

Simbología de notas en la Tabla III:

-d = no se despega

+d = se despega

-f = no se fractura a la flexión

+f = se fractura a la flexión

NA= no se realizó la prueba

APLICADA CON VARILLA DE VIDRIO		prueba al tacto		prueba a la flexión	
		Placa de vidrio	Tiras de PET	Placa de vidrio	Tiras de PET
gel de sílice G-60 en yeso	1:1	-d	+d	NA	+f
	2:1	-d	+d	NA	+f
	3:1	-d	+d	NA	+f
	4:1	+d	+d	NA	+f
CMC Sigma	en etanol	20%	+d	NA	+f
		40%	+d	NA	+f
		60%	+d	NA	+f
		80%	+d	NA	+f
	en agua	20%	+d	NA	+f
		40%	+d	NA	+f
		60%	+d	NA	+f
		80%	+d	NA	+f
CMC LFM	en etanol	20%	+d	NA	-f
		40%	+d	NA	-f
		60%	+d	NA	-f
		80%	+d	NA	-f
	en agua	20%	+d	NA	+f
		40%	+d	NA	+f
		60%	+d	NA	+f
		80%	+d	NA	+f

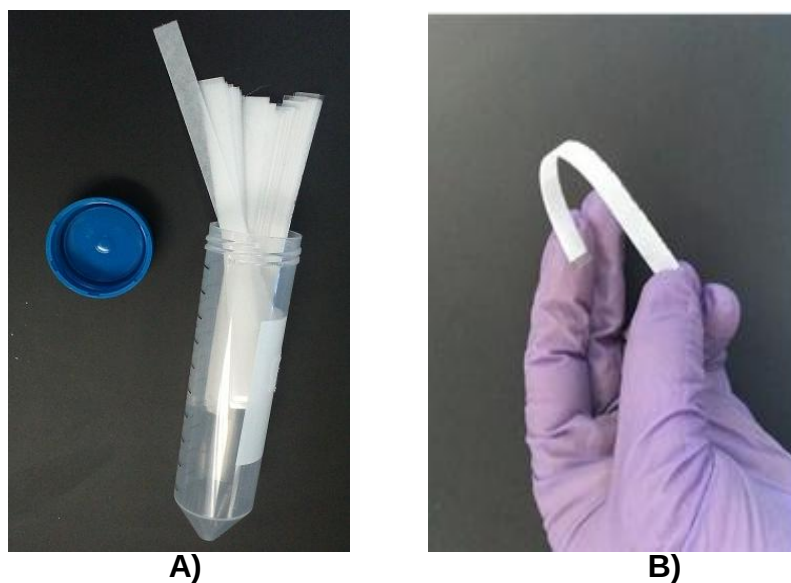


Figura 7. A) Aspecto translúcido de las tiras de PET con celulosa microcristalina producida en el Laboratorio de Farmacología Marina. B) prueba de flexión.

Tabla IV. Resultados de pruebas de adsorción y fractura de gel de sílice y celulosa microcristalina aplicada con aerógrafo en placas de vidrio y tiras de PET.

Simbología de notas en la Tabla IV:

-d = no se despegó

+d = se despegó

-f = no se fracturó a la flexión

+f = se fracturó a la flexión

NA= no se realizó la prueba

APLICADA POR ASPERSON CON AERÓGRAFO		prueba al tacto		prueba a la flexión		
		Placa de vidrio	Tiras de PET	Placa de vidrio	Tiras de PET	
gel de sílice G-60 en yeso		1:1	-d	+d	NA	+f
		2:1	-d	+d	NA	+f
		3:1	-d	+d	NA	+f
		4:1	+d	+d	NA	+f
CMC Sigma	en etanol	20%	+d	+d	NA	+f
		40%	+d	+d	NA	+f
		60%	+d	+d	NA	+f
		80%	+d	+d	NA	+f
	en agua	20%	+d	+d	NA	+f
		40%	+d	+d	NA	+f
		60%	+d	+d	NA	+f
		80%	+d	+d	NA	+f
CMC LFM	en etanol	20%	+d	-d	NA	-f
		40%	+d	-d	NA	-f
		60%	+d	-d	NA	-f
		80%	+d	-d	NA	-f
	en agua	20%	+d	+d	NA	+f
		40%	+d	+d	NA	+f
		60%	+d	+d	NA	+f
		80%	+d	+d	NA	+f

B. Productos de reacción

Los productos de reacción de N con P, K y D (Fig. 8), fueron caracterizados espectrofotométricamente. Los parámetros en los que se hizo la caracterización fueron: absorción máxima o a_{max} , longitud de onda de máxima absorción o λ_{max} y el tiempo de estabilidad o t_e . Los coeficientes de extinción molar, milimolar y en mg/L (mg/L = partes por millón).

ξ_M , ξ_{mM} y $\xi_{mg/L}$ se calcularon respectivamente mediante la fórmula:

$$\xi = \frac{a_{max}}{lc}$$

donde:

ξ = coeficiente de extinción molar

a_{max} = absorción máxima

l = longitud de la celda en cm

c = concentración de la solución en moles/L

El coeficiente de determinación R^2 de la curva de calibración se terminó mediante el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson.

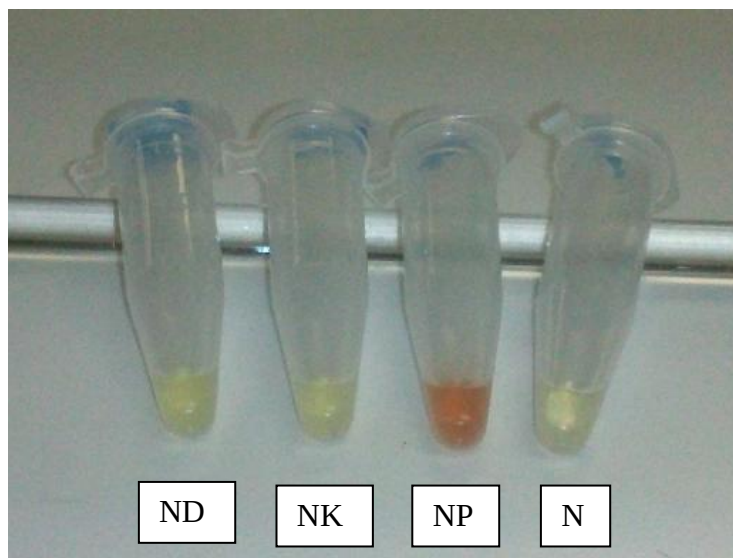


Figura 8. Muestra las tonalidades de amarillo de los cromóforos que se producen al reaccionar ácido domoico, ácido kaínico y prolina con el reactivo N.

En la tabla siguiente se muestran los resultados de parámetros espectrofotométricos.

Tabla V. Parámetros espectrofotométricos de los productos de reacción del reactivo N+ácido domoico, el reactivo N+ácido kaínico y el reactivo N +prolina.

producto de reacción	$\lambda_{\max}$	t_e	ξ_M	ξ_{mM}	$\xi_{mg/L}$	ecuación	R^2
N+D	413	95 min	4596.7	4.5967	0.0148	$abs=4596.7M+0.0065$	0.9959
N+K	413	240 min	2575.4	2.5754	0.0121	$abs=2575.4M+0.0336$	0.9799
N+P	400	50 min	1255.6	1.2556	0.0109	$abs=1.2556M+0.0764$	0.9962

Se obtuvo el tiempo estabilización t_e de la reacción de N con D, K y P a 20 mg/L y poder establecer un tiempo óptimo para realizar una prueba prototipo. Se llevó a cabo un registro de absorbancias de cada producto de reacción entre 400 y 600 nm a intervalos de 5 minutos, hasta que la absorbancias se mantuviesen constantes por lo menos en dos lecturas consecutivas y empezara a disminuir. En el mismo experimento se pudo determinar la $\lambda_{\max}$ de cada producto de reacción.

Tiempo de estabilización t_e y $\lambda_{\max}$ del producto de reacción ND a 20 mg/L

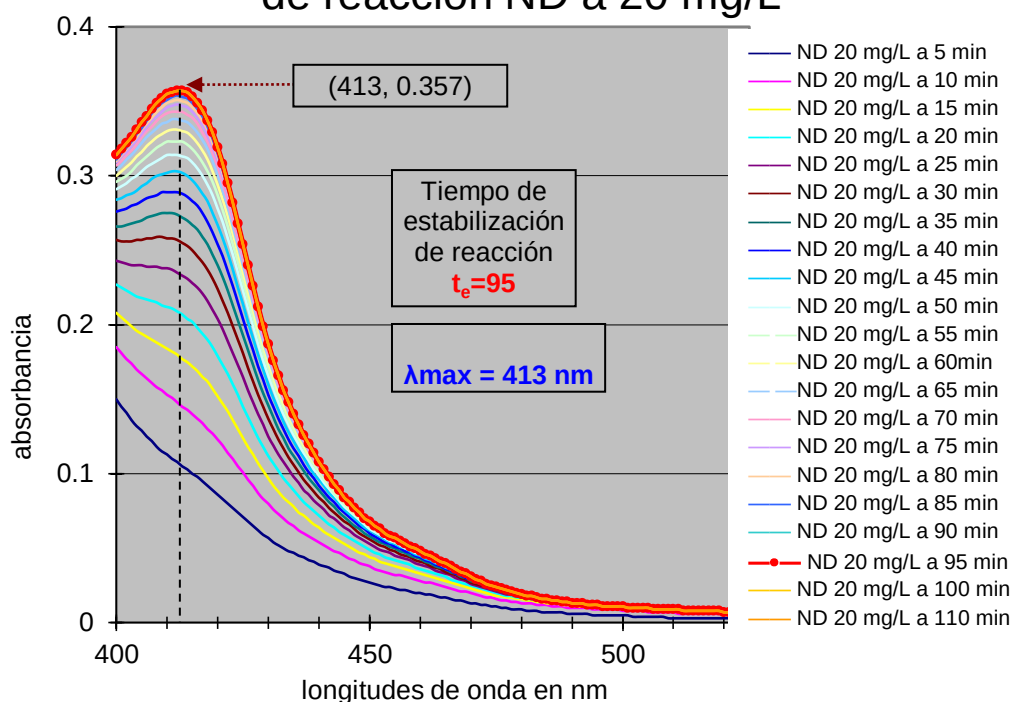


Figura 9. $\lambda_{\max}$ y tiempo de estabilización t_e del producto de reacción del reactivo N + ácido domoico a 20 mg/L, absorbancias tomadas cada 5 minutos entre 400 y 600 nm.

La reacción de N con D produce un cromóforo amarillo cuya longitud de onda de máxima absorción o $\lambda_{\max} = 413 \text{ nm}$ y se estabiliza en un tiempo $t_e = 95$ min (Fig. 9). Es decir, después de 95 minutos deja de incrementar su absorbancia y permanece estable en un valor de 0.357 unidades de absorbancia por 110 minutos.

Tiempo de estabilización y $\lambda_{\max}$ del producto de reacción: NK a 20 mg/L

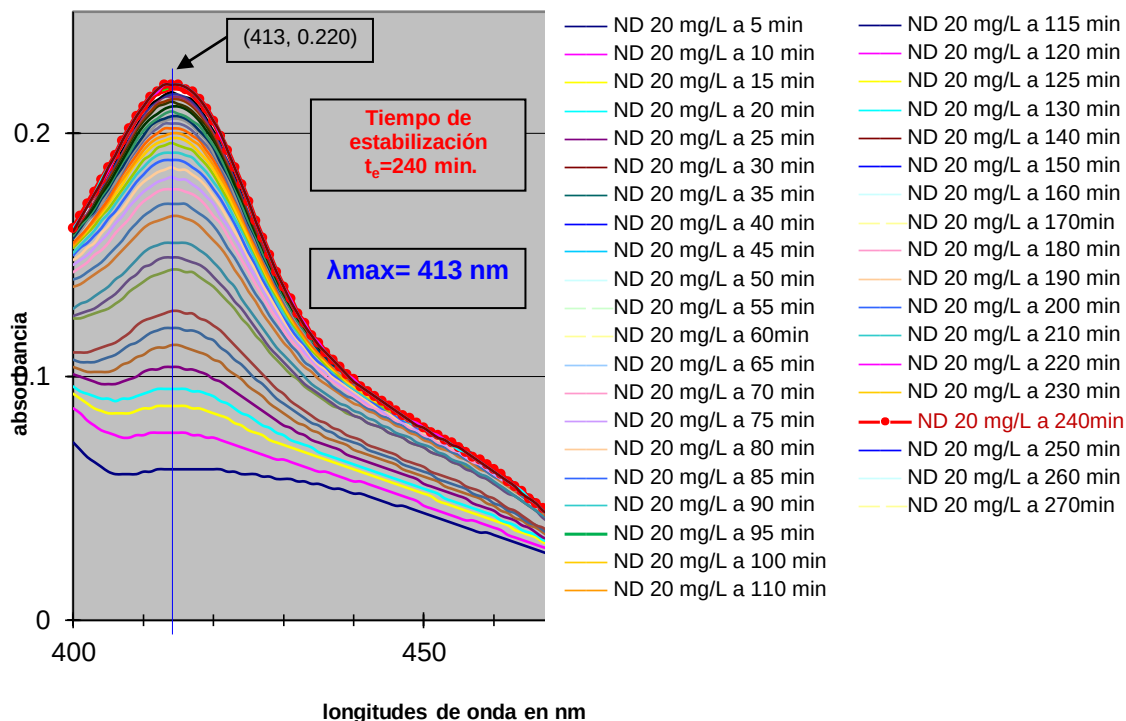


Figura 10. $\lambda_{\max}$ y tiempo de estabilización t_e del producto de reacción del reactivo N + ácido kaínico a 20 mg/L, absorbancias tomadas cada 5 minutos entre 400 y 600 nm.

La reacción de N con K produce un cromóforo amarillo cuya longitud de onda de máxima absorción o $\lambda_{\max} = 413$ nm y se estabiliza en un tiempo $t_e = 240$ min (Fig. 10). Es decir después de 240 minutos deja de incrementar su absorbancia y permanece estable en un valor de 0.220 unidades de absorbancia por 1.5 horas.

Tiempo de estabilización y lambda max del producto de reacción NP a 20 mg/L

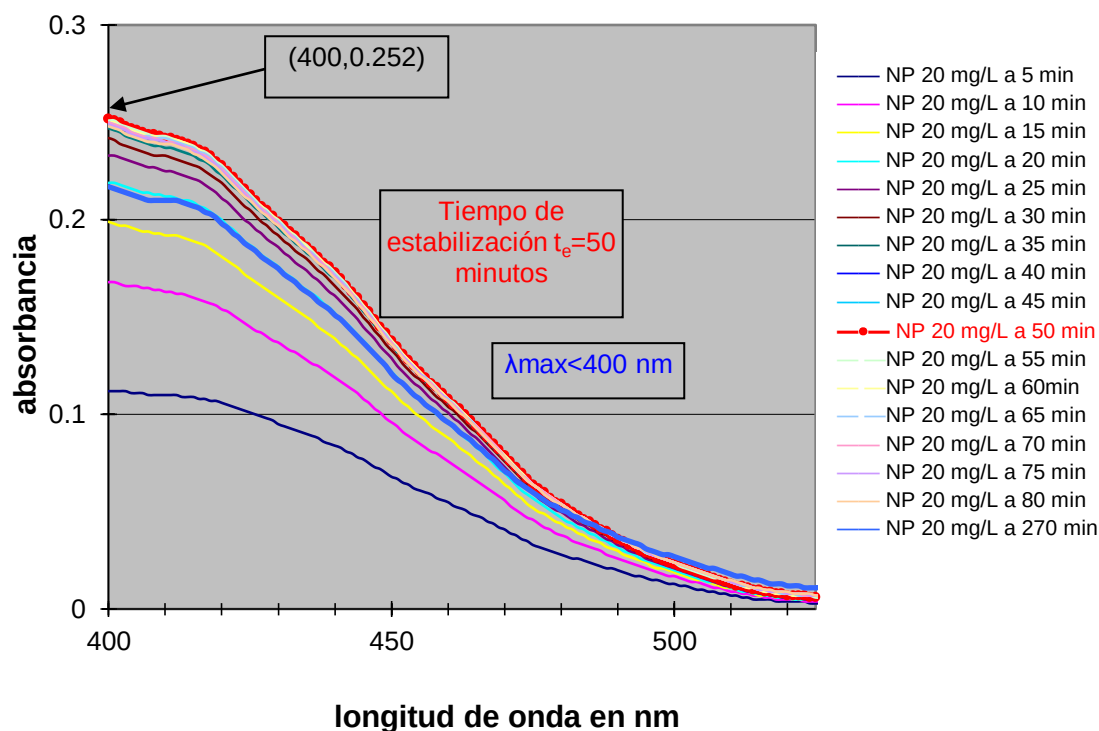


Figura 11. $\lambda_{\max}$ y tiempo de estabilización t_e del producto de reacción del reactivo N + prolina a 20 mg/L, absorbancias tomadas cada 5 minutos entre 400 y 600 nm.

La reacción de N con P produce un cromóforo amarillo cuya longitud de onda de máxima absorción o $\lambda_{\max} < 400$ nm y se estabiliza en un tiempo $t_e = 50$ min (Fig. 11). Es decir después de 50 minutos deja de incrementar su absorbancia y permanece estable en un valor de 0.252 unidades de absorbancia por 0.5 horas.

Buscando la linealidad del cambio de la absorbancia respecto del tiempo se corrió una serie de espectros de los productos de reacción del reactivo N 1% con D, K y P a 5, 10, 20, 30, 40 mg/L (Figs. 12, 13 y 14). Se registraron lecturas de absorbancia cada 5 minutos de cada producto de reacción a su correspondiente $\lambda_{\max}$ y t_e .

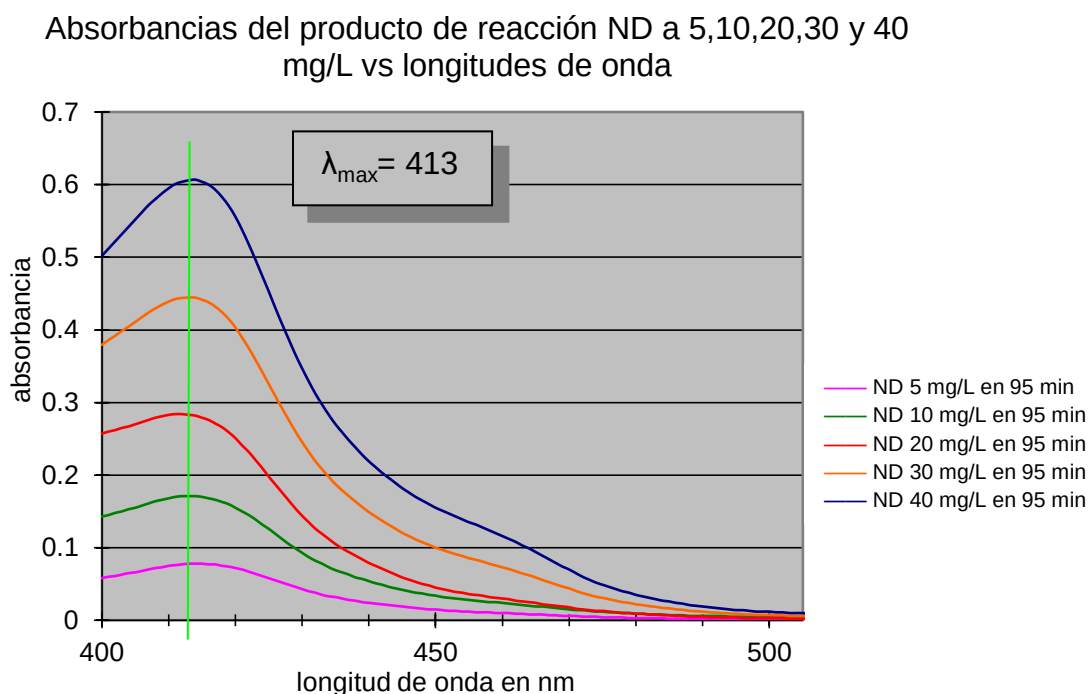


Figura 12. Variación de la absorbancia al tiempo de estabilización $t_e = 95$ min y $\lambda_{\max} = 413$ nm del producto de reacción del reactivo N + ácido domoico a 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L. Barridos entre 400 y 600 nm cada 5 minutos.

Las curvas de concentración a 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L (Fig. 12), muestran picos consistentes con los barridos para determinar el tiempo de estabilización

t_e ; a $\lambda_{\max} = 413 \text{ nm}$. La absorbancia aumenta a medida que pasa el tiempo, mientras que la curva mantiene la forma.

Absorbancias del producto de reacción NK a 5,10,20,30 y 40 mg/L vs longitudes de onda

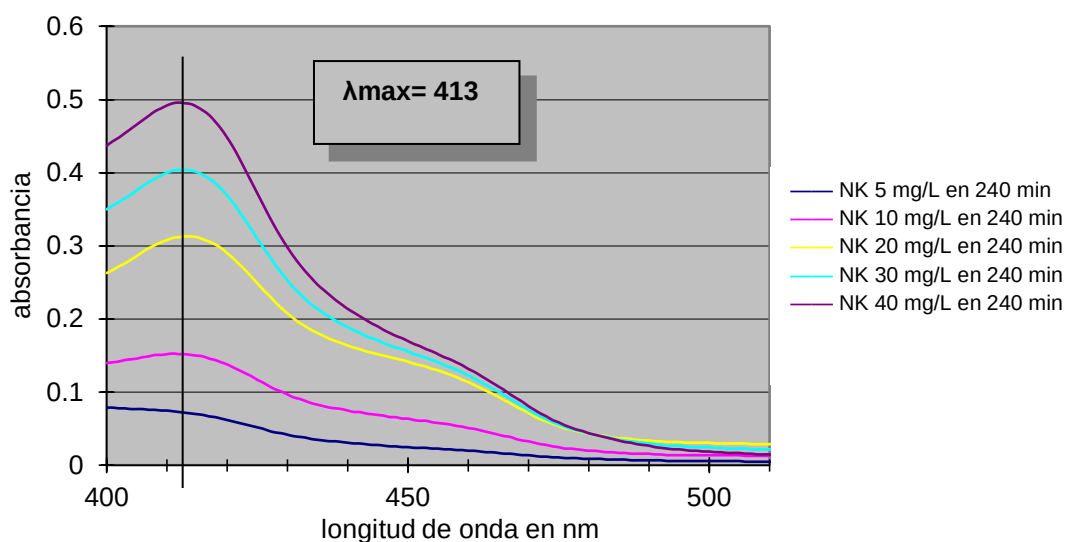


Figura 13. Variación de la absorbancia al tiempo de estabilización $t_e = 240 \text{ min}$ y $\lambda_{\max} = 413 \text{ nm}$ del producto de reacción del reactivo N + ácido kaínico a 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L. Barridos entre 400 y 600 nm cada 5 minutos.

Las curvas de concentración a 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L (Fig. 13) muestran picos consistentes a con los barridos para determinar el tiempo de estabilización t_e ; a $\lambda_{\max} = 413 \text{ nm}$. La absorbancia aumenta a medida que pasa el tiempo, mientras que la curva mantiene la forma.

Absorbancias del producto de reacción NP a 5,10,20,30 y 40 mg/L vs longitudes de onda

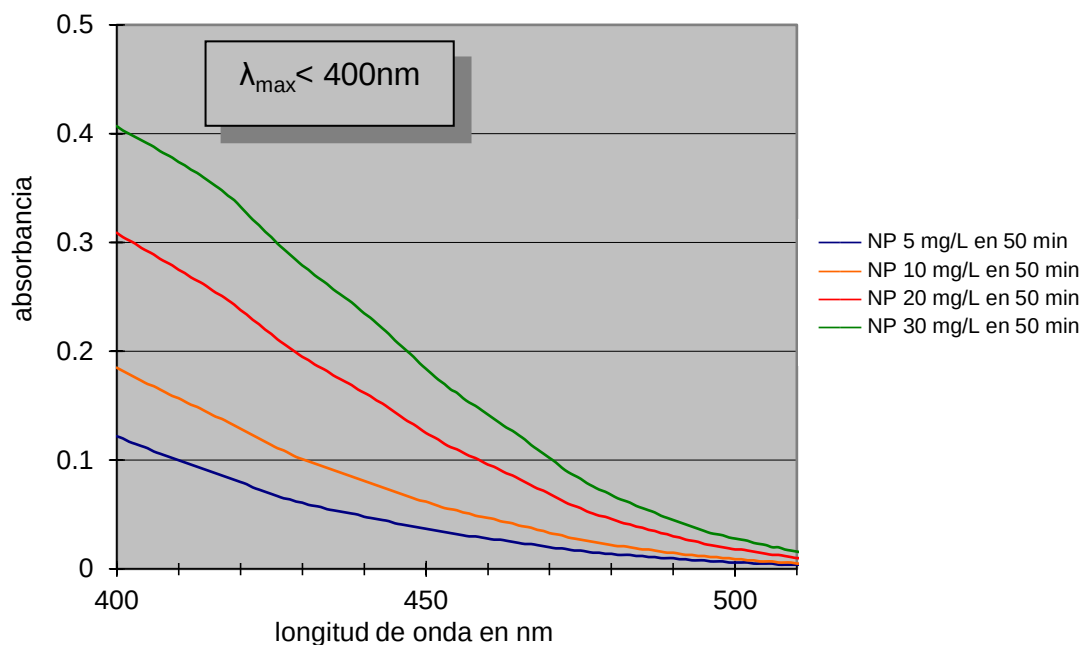


Figura 14. Variación de la absorbancia al tiempo de estabilización $t_e = 50$ min y $\lambda_{\max} < 400$ nm del producto de reacción del reactivo N + prolina a 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L. Barridos entre 400 y 600 nm cada 5 minutos.

Las curvas de concentración a 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L (Fig. 14) muestran picos consistentes con los barridos para determinar el tiempo de estabilización t_e ; a $\lambda_{\max} < 400$ nm. La absorbancia aumenta a medida que pasa el tiempo, mientras que la curva mantiene la forma.

Con el objetivo de obtener los coeficientes de absorción ξ_M , ξ_{mM} , $\xi_{mg/L}$ de cada producto de reacción se tomaron lecturas de absorbancia a su $\lambda_{\max}$ y t_e

correspondientes. Se construyeron curvas de calibración de absorbancias contra concentración molar (Figs, 15, 16 y 17) y se determinó mediante mínimos cuadrados la linealidad de la variación, su coeficiente de determinación R^2 y la ecuación correspondiente.

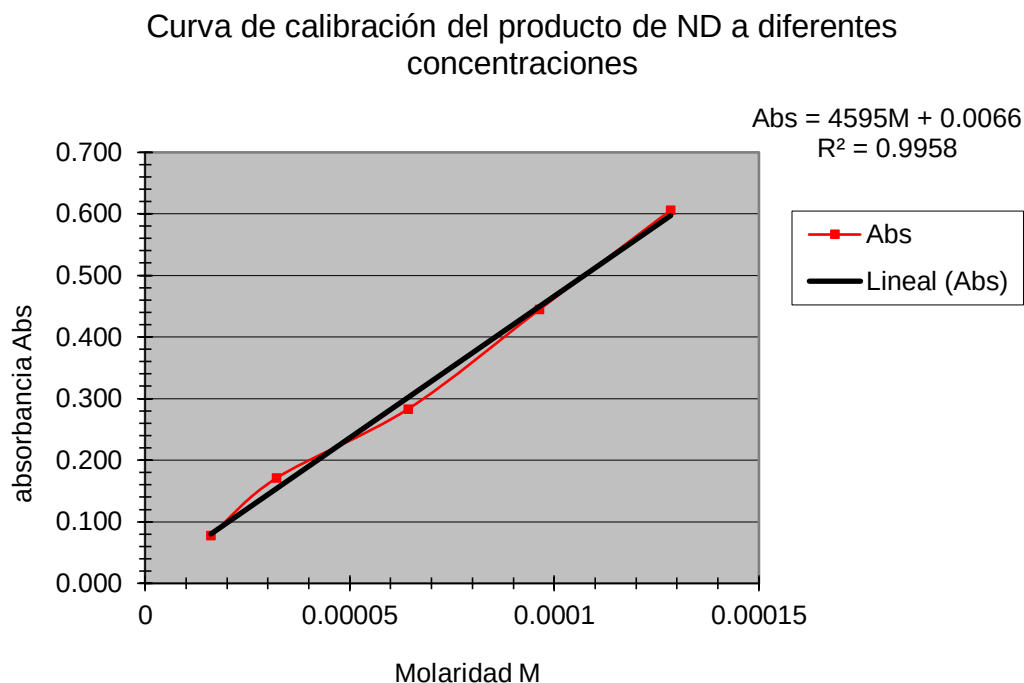


Figura 15. Muestra la variación de la absorbancia del producto de reacción del reactivo N + ácido domoico respecto de la molaridad de ácido domoico, la ecuación correspondiente y el coeficiente de determinación R^2 .

Tabla VI. Coeficientes de extinción del producto de reacción del reactivo N+ácido domoico.

$t_e=95 \text{ min}$			$\lambda_{\max}=413$			
mg/L	mM	M	Abs	ξmM	ξM	$\xi \text{mg/L}$
5	0.016060	1.60601E-05	0.078	4.857	4856.748	0.016
10	0.032120	3.21203E-05	0.171	5.324	5323.743	0.017
20	0.064241	6.42405E-05	0.283	4.405	4405.320	0.014

30	0.096361	9.63608E-05	0.445	4.613	4612.873	0.015
40	0.128481	12.8481E-05	0.606	4.717	4716.650	0.015

Curva de calibración del producto de reacción NK a diferentes concentraciones

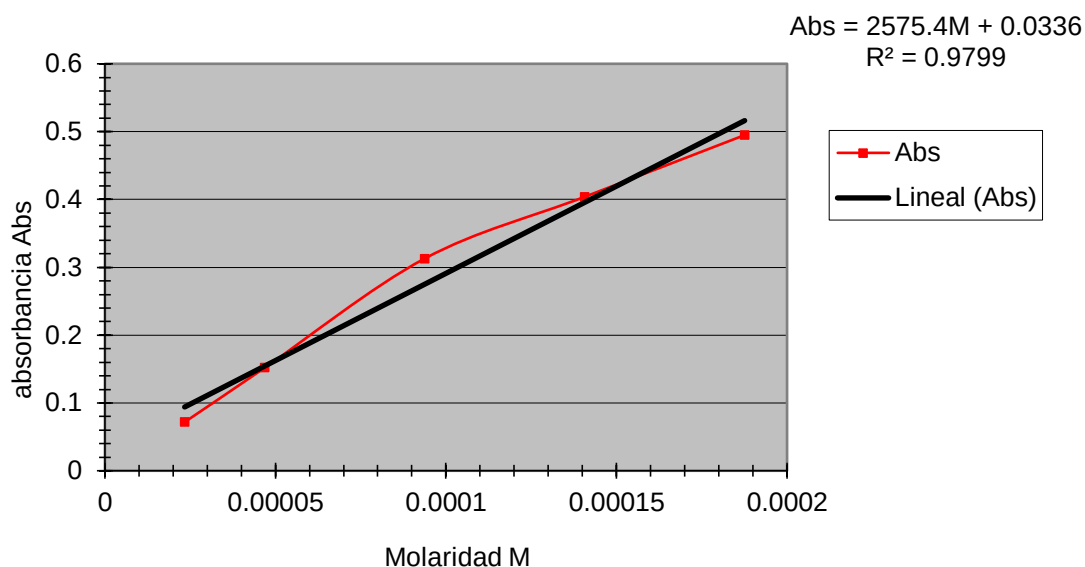


Figura 16. Muestra la variación de la absorbancia del producto de reacción del reactivo N + ácido kaínico respecto de la molaridad de ácido kaínico, la ecuación correspondiente y el coeficiente de determinación R².

Tabla VII. Coeficientes de extinción del producto de reacción del reactivo N+ácido kaínico.

$t_e=240$ $\lambda_{max}=413$						
mg/L	mM	M	Abs	ξ_{mM}	ξ_M	$\xi_{mg/L}$
5	0.023449	2.34489E-05	0.072	3.071	3070.512	0.014
10	0.046898	4.68977E-05	0.152	3.241	3241.096	0.015
20	0.093795	9.37954E-05	0.313	3.337	3337.050	0.016
30	0.140693	14.0693E-05	0.404	2.871	2871.497	0.013
40	0.187591	18.7591E-05	0.495	2.639	2638.721	0.012

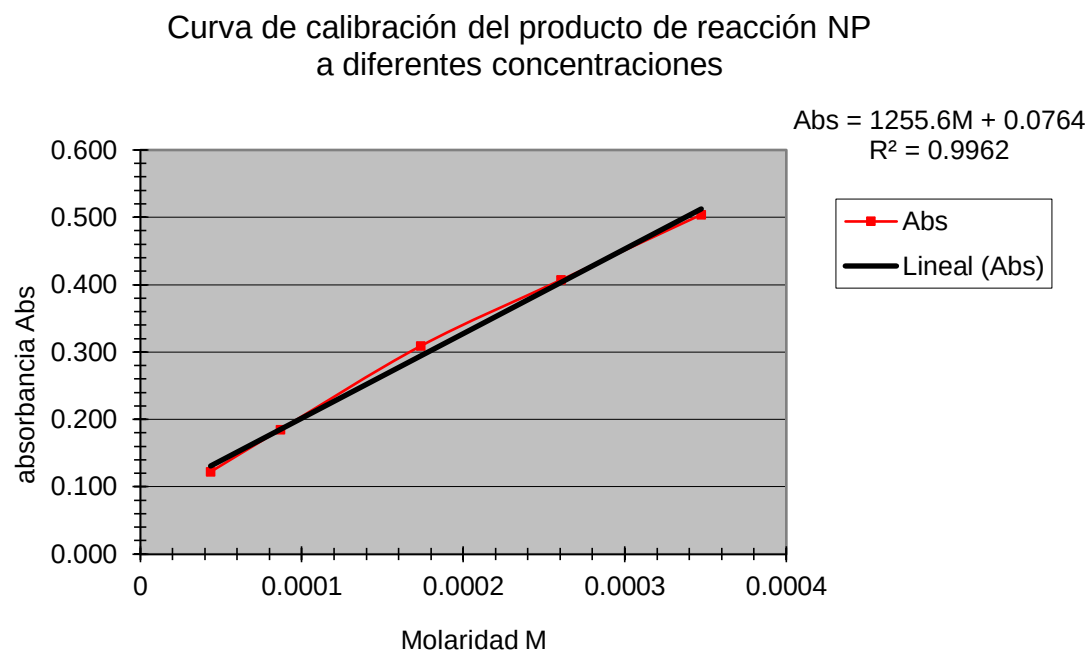


Figura 17. Muestra la variación de la absorbancia del producto de reacción del reactivo N + prolina respecto de la molaridad de prolina, la ecuación correspondiente y el coeficiente de determinación R².

Tabla VIII. Coeficientes de extinción del producto de reacción del reactivo N + prolina.

$t_e=50 \text{ min}$ $\lambda_{\max}=400$						
mg/L	mM	M	Abs	ξmM	ξM	$\xi\text{mg/L}$
5	0.043429	4.34292E-05	0.122	2.809	2809.172	0.024
10	0.086858	8.68583E-05	0.185	2.130	2129.905	0.019
20	0.173717	17.3717E-05	0.309	1.779	1778.759	0.015
30	0.260575	26.0575E-05	0.407	1.562	1561.930	0.014
40	0.347433	34.7433E-05	0.504	1.451	1450.638	0.013

Para obtener el comportamiento cinético de cada reacción; se tomaron lecturas de absorbancia cada 5 minutos. En reacciones con N montadas por separado; se colocaron a 20 mg/L de D, K y P. Se tomaron lecturas antes y

después del tiempo de estabilidad de reacción t_e a la longitud de onda de máxima absorción $\lambda_{\max}$ correspondiente. Los datos de absorbancia contra tiempo de reacción se muestran en las tablas IX para D, X para K y XI para P. Los gráficos correspondientes se muestran debajo de cada tabla en las figuras 18 para D, 19 para K y 20 para P.

Tabla IX. Absorbancias a tiempos de la reacción del reactivo N+ácido domoico a $\lambda_{\max} = 413 \text{ nm}$.

Tiempo en min	Abs	Tiempo en min	abs
5	0.110	70	0.343
10	0.150	75	0.347
15	0.180	80	0.350
20	0.210	85	0.353
25	0.230	90	0.355
30	0.260	95	0.357
35	0.270	100	0.357
40	0.290	110	0.357
45	0.300	140	0.357
50	0.310	170	0.357
55	0.320	200	0.357
60	0.330	230	0.353
65	0.340		

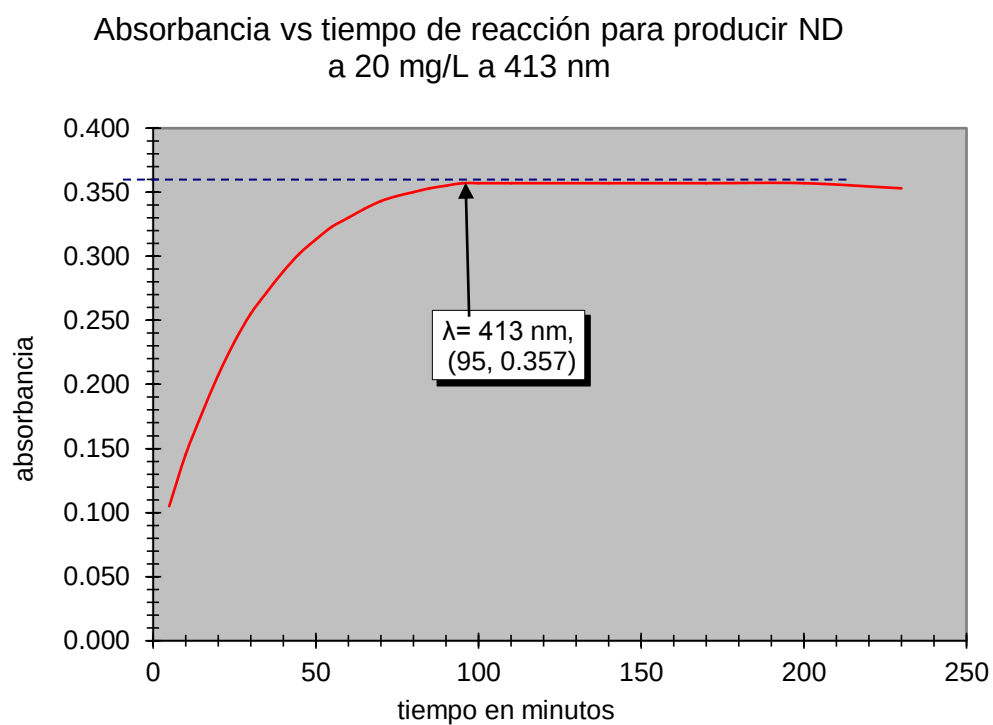


Figura 18. Curva de absorbancia contra tiempo del producto de reacción del reactivo N+ácido domoico a $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$.

Tabla X. Absorbancias a tiempos de la reacción del reactivo N+ácido kaínico a $\lambda_{\text{max}}=413$ nm.

Tiempo en min	abs	Tiempo en min	abs	Tiempo en min	abs
5	0.060	80	0.190	190	0.220
10	0.080	85	0.190	200	0.220
15	0.090	90	0.190	210	0.220
20	0.100	95	0.200	220	0.220
25	0.100	100	0.200	230	0.220
30	0.110	105	0.200	240	0.220
35	0.120	110	0.200	250	0.220
40	0.130	115	0.200	260	0.220
45	0.140	120	0.210	270	0.220
50	0.150	125	0.210	300	0.220
55	0.160	130	0.210	330	0.220
60	0.170	140	0.210	360	0.220
65	0.170	150	0.210	390	0.220
70	0.180	160	0.210		
75	0.180	180	0.220		

**Absorbancia vs tiempo de reacción para la formación de NK
a 20 mg/L y 413 nm**

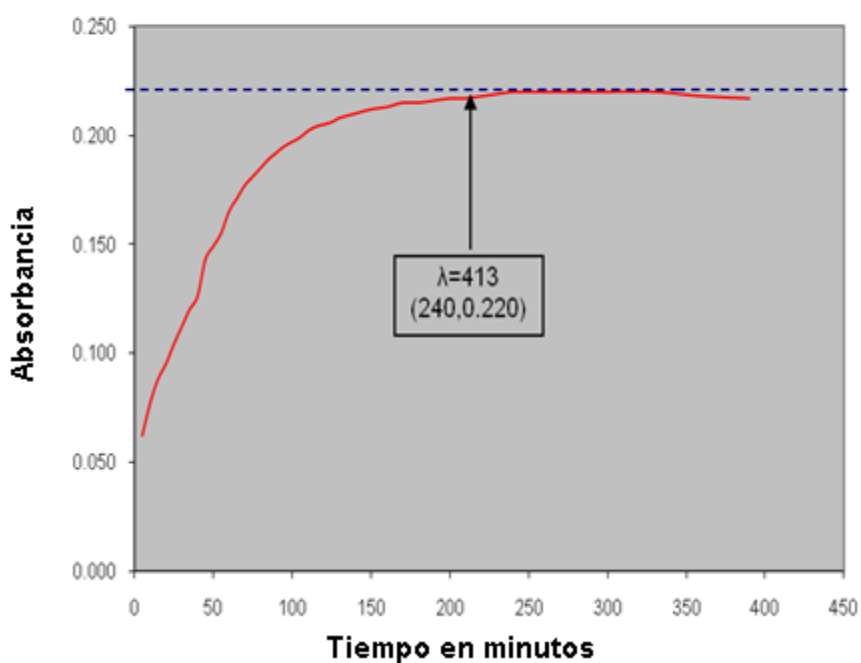


Figura 19. Curva de absorbancia contra tiempo del producto de reacción del reactivo N+ácido kaínico a $\lambda_{\text{max}} = 413$ nm.

Tabla XI. Absorbancias a tiempos de la reacción del reactivo N+prolina a $\lambda_{\text{max}} = 400$ nm.

Tiempo en min	abs	Tiempo en min	abs
5	0.112	50	0.252
10	0.168	55	0.251
15	0.199	60	0.250
20	0.219	65	0.250
25	0.233	70	0.250
30	0.242	75	0.249
35	0.247	80	0.248
40	0.250	207	0.217
45	0.251		

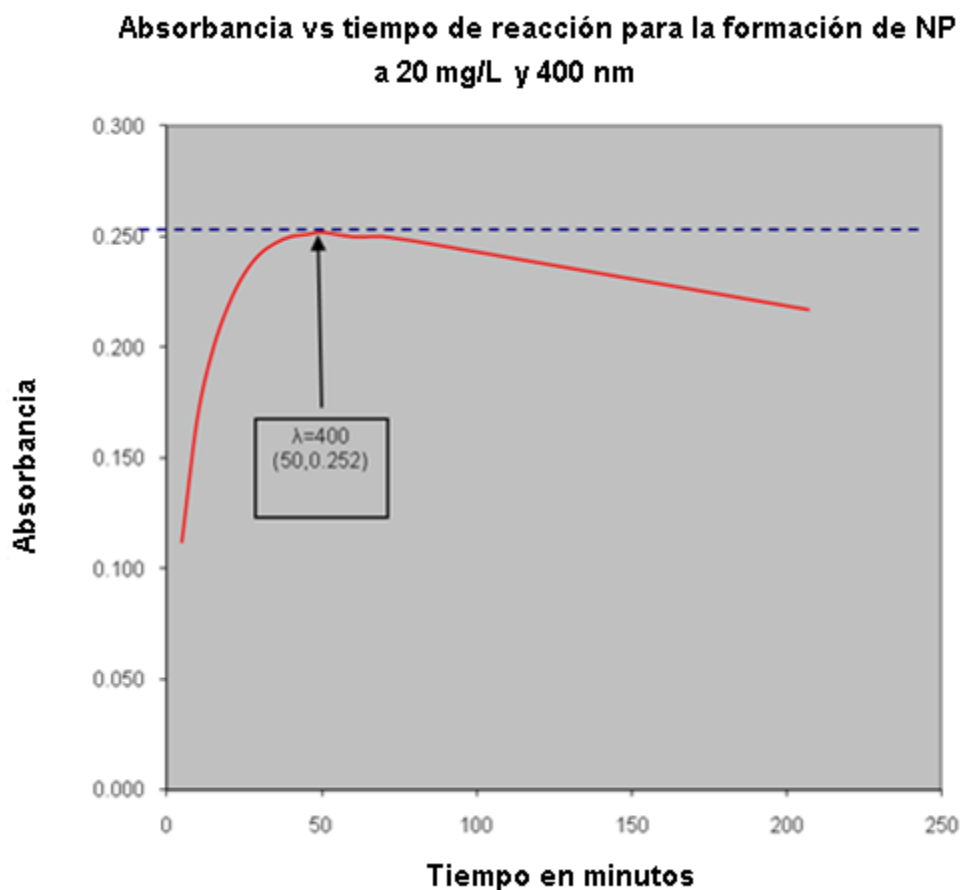


Figura 20. Curva de absorbancia contra tiempo del producto de reacción del reactivo N +prolina a $\lambda_{\text{max}} = 400$ nm.

Las curvas de absorbancia anteriores (Figs. 18, 19 y 20), muestran un comportamiento logarítmico complejo en el que sólo hay una linealidad aceptable ($R^2 > 0.95$) entre absorbancias de 0.000 a 0.323 para D, de 0.000 a 0.202 para K y de 0.000 a 0.219 para P. Los gráficos de linealidad de intervalo que se muestran en las figuras 21, 22 y 23 ilustran este comportamiento para las absorbancias frente al tiempo; en cada producto de reacción.

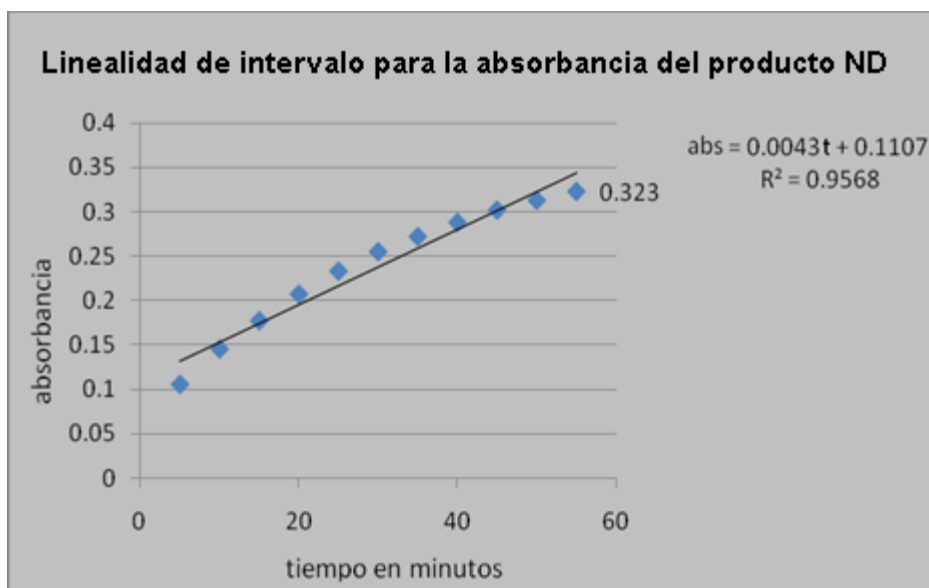


Figura 21. Linealidad de intervalo para las absorbancias del producto de reacción del reactivo N+ácido domoico.

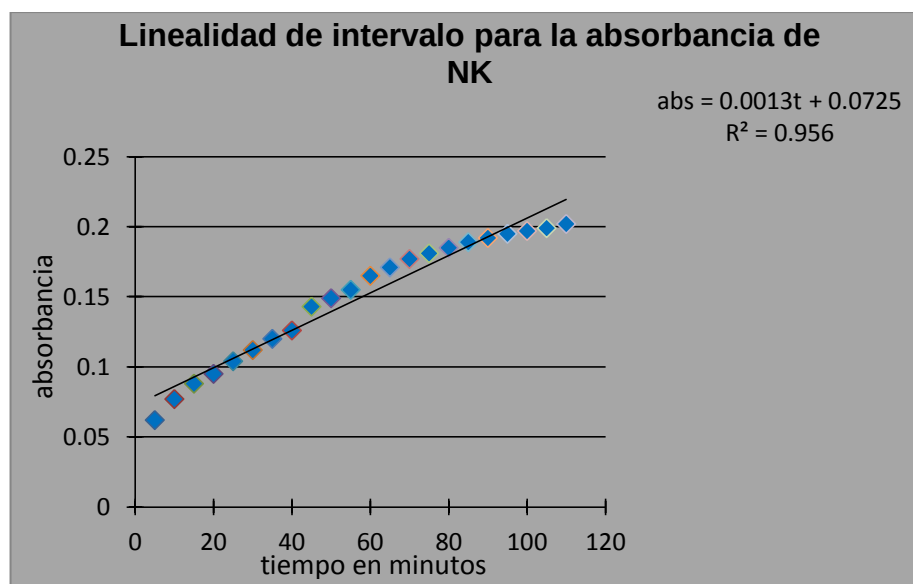


Figura 22. Linealidad de intervalo para las absorbancias del producto de reacción del reactivo N+ácido kaínico.

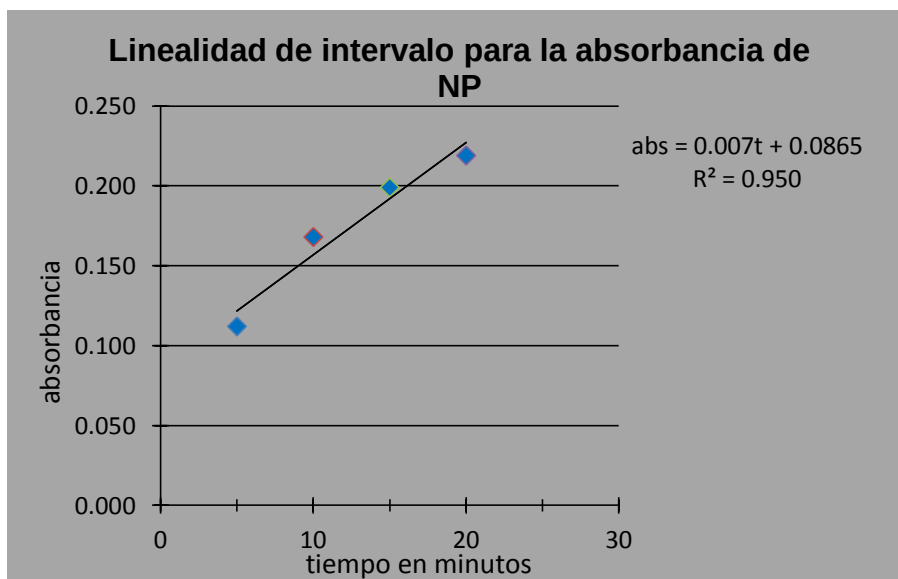


Figura 23. Linealidad de intervalo para las absorbancias del producto de reacción del reactivo N +prolina.

C. Proporción óptima de solventes y cromatografía de capa fina

Buscando la separación de las manchas cromatográficas de los productos de reacción, se realizaron experimentos preliminares con diferentes solventes. Se usó etanol acetona, isopropanol, diclorometano, éter anhidro y hexano. Las corridas cromatográficas se hicieron inicialmente en tubos de plástico, pero la persistencia de manchas difusas sin importar el cambio de solventes, nos hizo optar por el uso de tubos de vidrio; para eliminar la posibilidad de influencia electrostática del montaje con tubos de plástico.

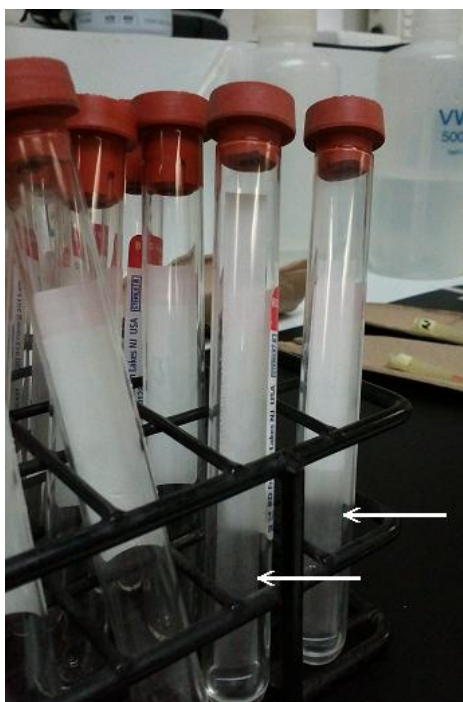


Figura 24. Aspecto translúcido de las corridas cromatográficas en tubos de vidrio con el uso de tiras PET con celulosa microcristalina producida en el Laboratorio de Farmacología.

D. Solventes preliminares

De los diferentes ensayos cromatográficos preliminares que se realizaron, destaca el realizado con mezclas de isopropanol (ISP) y ácido acético (AA) en agua. Estas mezclas lograron producir diferentes R_f para los productos de reacción montadas por separado; sin embargo las reacciones montadas en un mismo tubo de reacción, muestran evidencias de fuertes interacciones entre los productos de reacción; de tal modo que para realizar una separación eficiente de los productos de reacción en mezclas de ND, NK y NP, se requirieron otros experimentos con otros sistemas de solventes.

E. Serie ácido acético- Isopropanol

La Figs. 25, 26, 27 y 28 muestran corridas cromatográficas de los productos de reacción en mezclas de isopropanol/ácido acético al 3% en varias proporciones.

Los cromatogramas muestran que las proporciones 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 del sistema de solventes ácido acético al 3% en ISP no lograron la separación de ND, NK y NP en M.

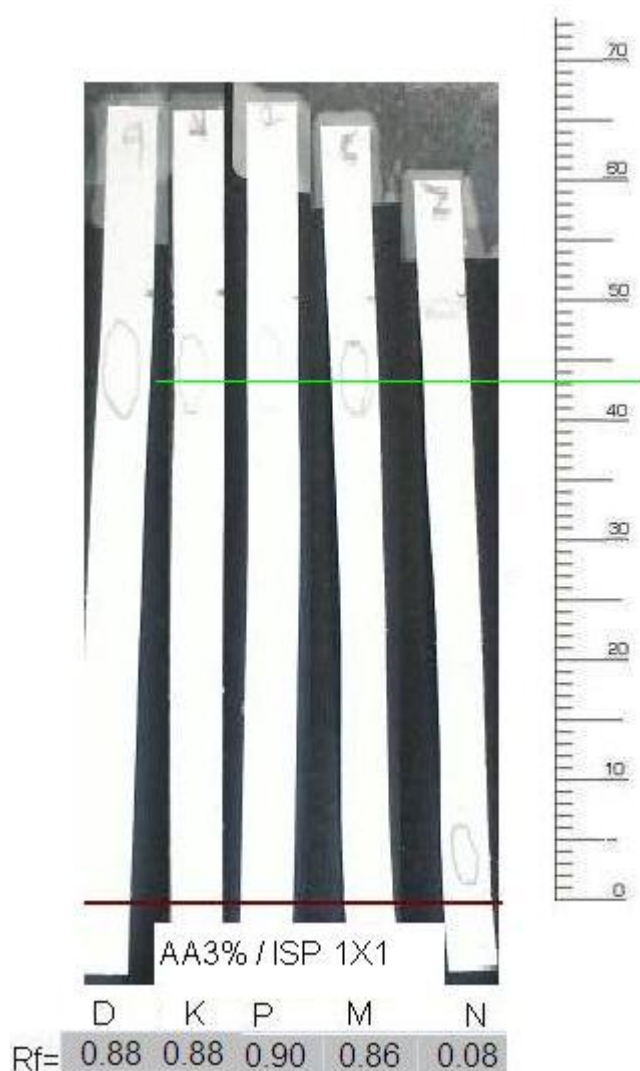


Figura 25. Se muestra un monitoreo de productos de reacción en el que se usa AA 3% e ISP 1 : 1 como fase móvil.



Figura 26. Se muestra un monitoreo de productos de reacción en el que se usa AA 3% / ISP 2x1 como fase móvil.

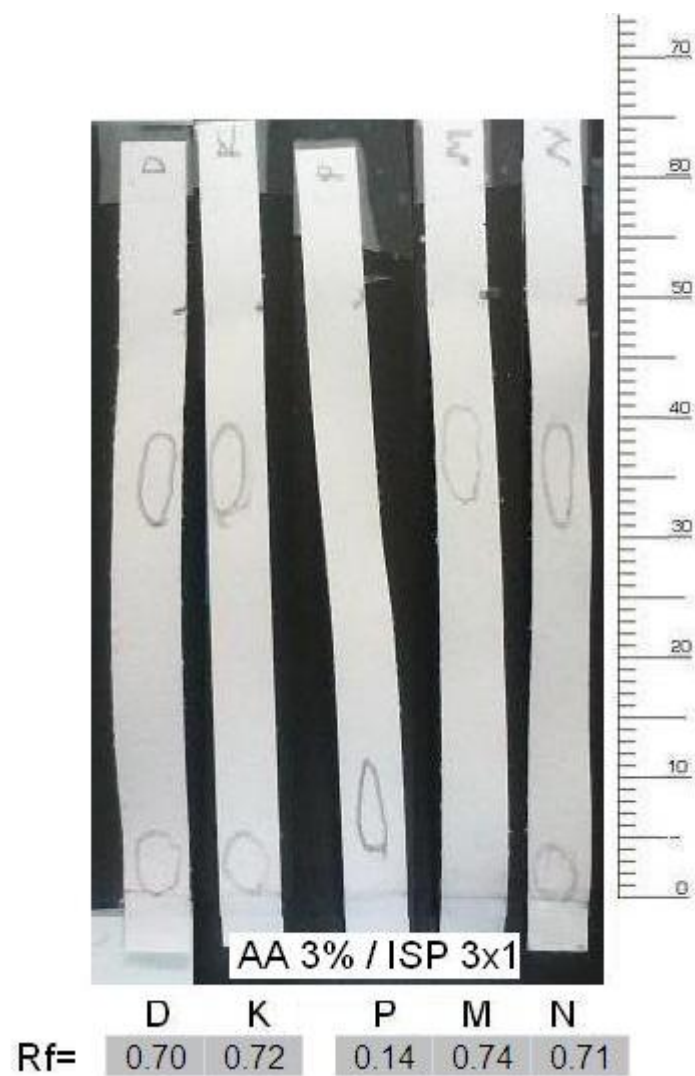


Figura 27. Se muestra un monitoreo de productos de reacción en el que se usa AA 3% / ISP 3x1 como fase móvil.

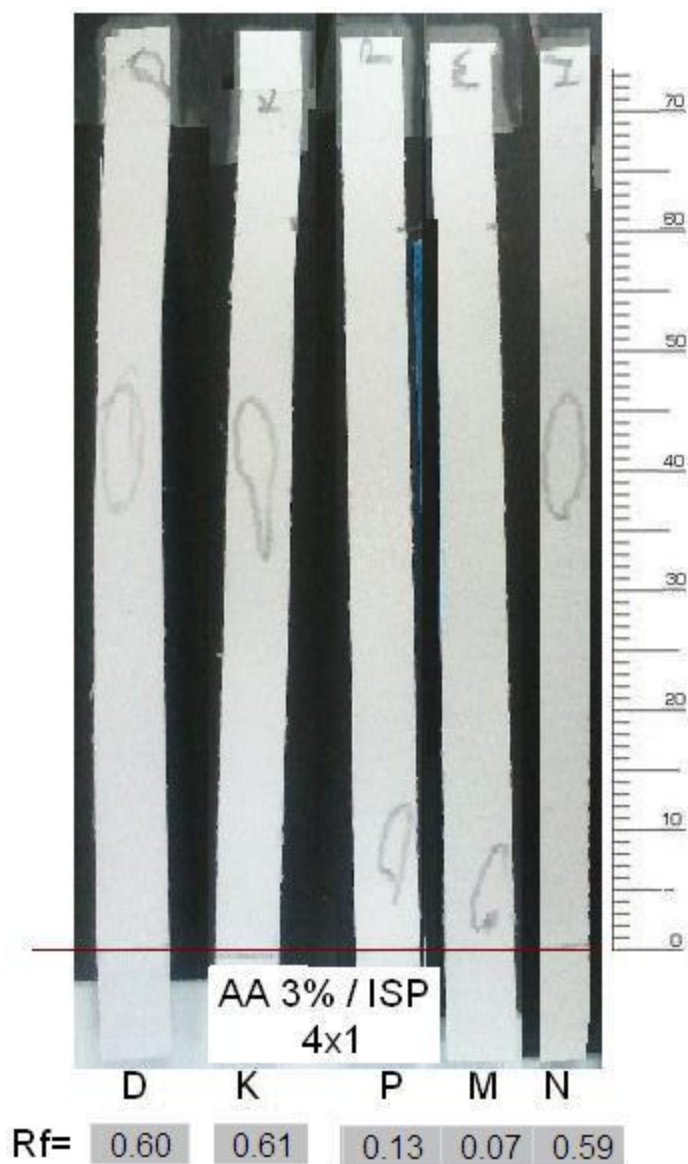


Figura 28. Se muestra un monitoreo de productos de reacción en el que se usa AA 3% / ISP 4x1 como fase móvil.

F. Serie acetona-NaOH

La Fig. 29, muestra cómo se logra separar ND de M en un sistema de solventes formado por acetona y NaOH (0.1 N) 1:2.

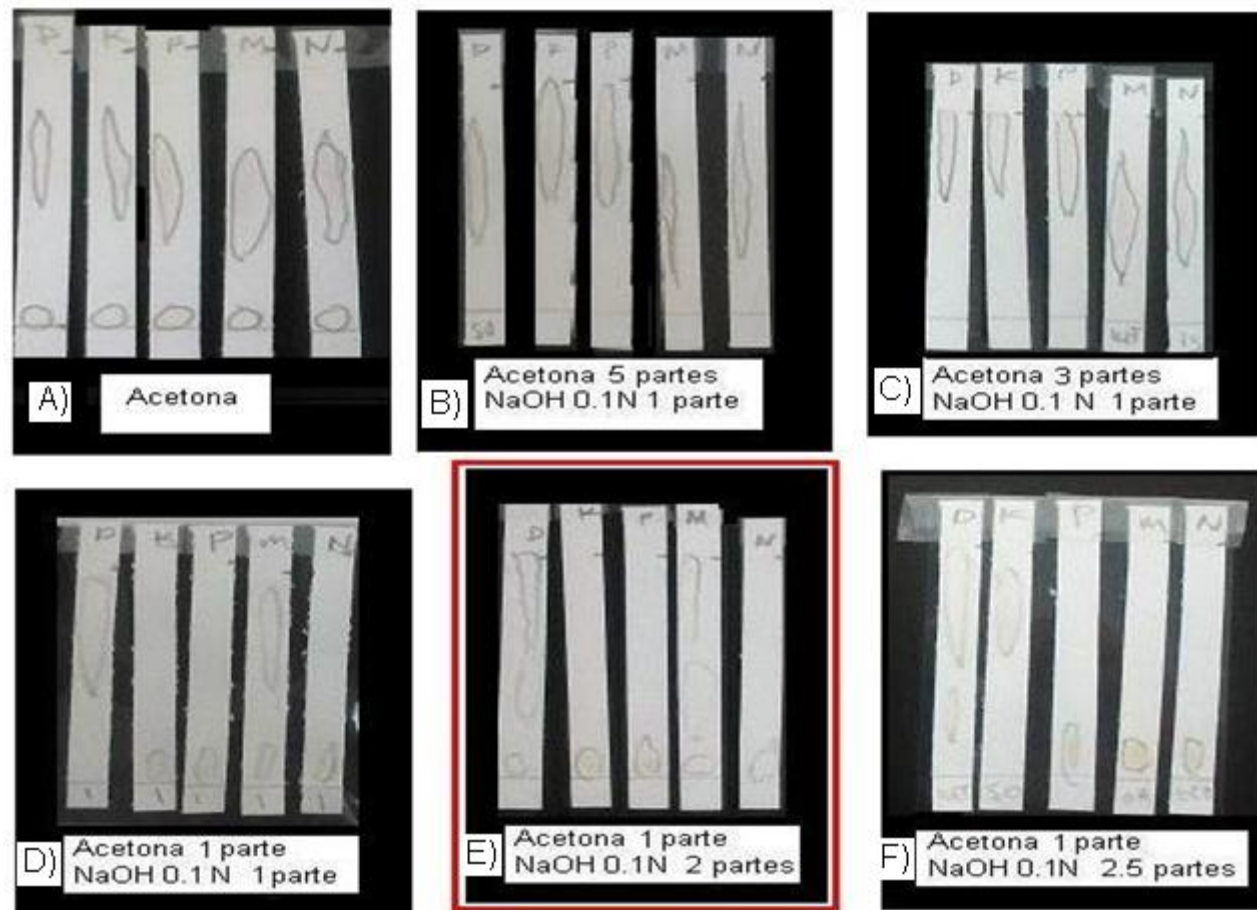


Figura 29. Cromatogramas de productos de reacción del reactivo N con ácido domoico D, ácido kaínico K, prolina P, un mezcla M de ácido domoico, ácido kaínico y prolina. En extremo derecho de cada fotografía también se muestra un cromatograma con el reactivo N sin reacción. Se usaron diferentes proporciones de acetona e NaOH.

G. Productos de reacción del extracto etanólico de mejillón

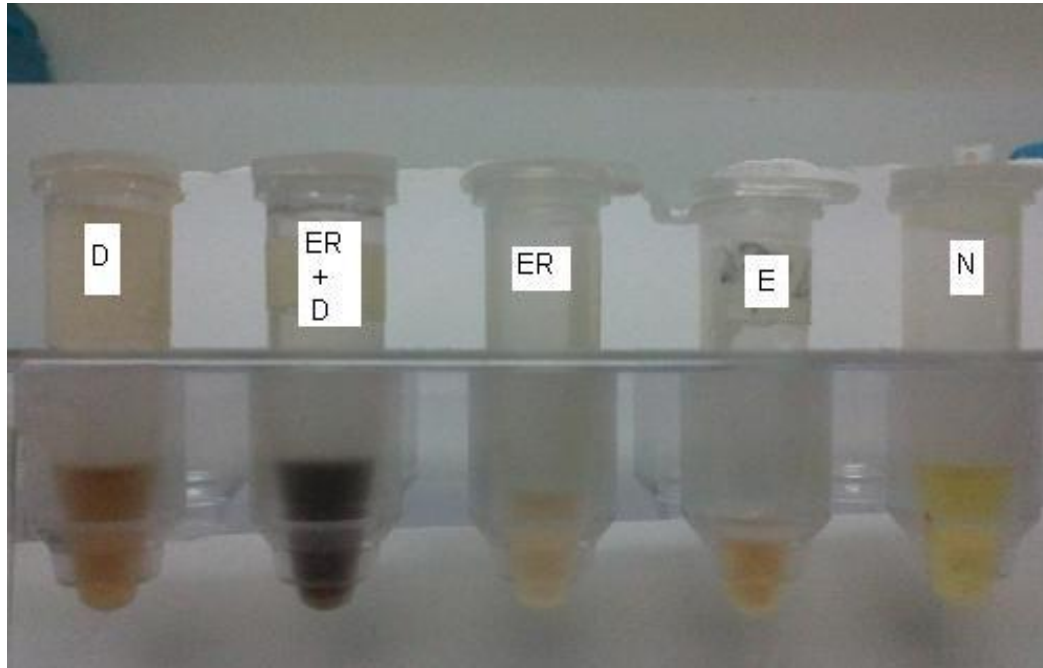


Figura 30. Aspecto de los productos de reacción del reactivo N al 1% con ácido domoico.
D=reacción del reactivo N con ácido domoico.
ER+D=reacción del reactivo N y del extracto etanólico de mejillón al que se le añadió ácido domoico..
ER= reacción del reactivo N con el extracto etanólico de mejillón.
E=extracto etanólico de mejillón.
N=reacción del reactivo N con etanol como blanco.

H. Cromatogramas de extracto etanólico

Se usó la solución de acetona-NaOH(0.1 N) en una relación 1 : 2, misma que logró separar los productos de reacción de la mezcla.



Figura 31. Tres juegos de cromatogramas de extracto etanólico de mejillón. Se muestran bajo iluminación con luz visible (izquierda) y un juego a luz ultravioleta UV (derecha). Cromatograma de productos de reacción del reactivo N al 1% con ácido domoico.

D=reacción del reactivo N con ácido domoico.

ER+D=reacción del reactivo N y del extracto etanólico de mejillón al que se le añadió ácido domoico.

ER= reacción del reactivo N con el extracto etanólico de mejillón.

E=extracto etanólico de mejillón.

N=reacción del reactivo N con etanol como blanco.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Soporte

Como podemos observar en las tablas III y IV, los resultados de la evaluación de flexibilidad y adsorción nos sugieren que la celulosa microcristalina LFM (CMC LFM) en etanol y aplicada con varilla de vidrio o por aspersión con aerógrafo en láminas de PET, cuenta con la flexibilidad necesaria para su uso rutinario en pruebas que realicen directamente en el campo de trabajo, ya que permanece adsorbida en la lámina de PET. Este hecho es de gran relevancia puesto que en nuestra búsqueda de una plataforma que presente entre otras características las de ser de fácil manejo y tener larga vida de anaquel, los resultados favorables de las pruebas de adsorción al tacto y a la flexión, contribuyen a un diseño más estable de prototipo. Las características antes mencionadas no se observaron al montar gel de sílice en agua o etanol ni al montar CMC LFM en agua. En estos montajes la fase estacionaria se desprendía al simple tacto o a la mínima flexión.

Por otro lado, la característica de transparencia que presenta la CMC LFM, facilita la calibración de las lecturas espectrofotométricas que se buscan en la fase óptica del prototipo. Los intentos de preparar una capa fina con gel de sílice en láminas de PET se aprecia en la Figura 6. En ella vemos que el gel de

sílice no produce superficies lo suficientemente transparentes o translúcidas como para ser considerada una plataforma potencial de un modelo de prototipo.

En las Figuras 7A) y 7B) se puede apreciar como las tiras de CMC en láminas de PET son translúcidas y flexibles, por lo que podrían utilizarse como plataforma viable en corridas cromatográficas; en las que no se requiera una preparación técnica del operario, mientras que se pueda utilizar para lecturas colorimétricas mediante un dispositivo práctico.

B. Productos de reacción

Aunque las diferencias estructurales de las moléculas de D, K y P radican principalmente en el número de carboxilos y el peso molecular, la distribución de cargas iónicas en la topología de la molécula juega un papel importante a considerar en los intentos de lograr una separación significativa.

La formación de los cromóforos ND, NK y NP a partir de la reacción con el reactivo revelador (N) y las deferentes soluciones estándar de D, K, y P (Fig.8), fueron caracterizados espectrofotométricamente para obtener sus coeficientes de extinción. Los coeficientes de extinción que se muestran en la tabla V, sugieren un comportamiento lo suficientemente lineal como para hacer cálculos de concentraciones basándose en lecturas de absorbancias, con índices de determinación $R^2 \geq 0.97$. Los cromóforos presentan diferentes absorbancias

máximas que se manifiestan a tiempos de estabilización muy diferentes (ver figuras 18, 19 y 20). Este hecho se podría utilizar para realizar lecturas diferenciadas de absorbancia y detectar un cromóforo determinado en función del tiempo.

Los tiempos de estabilización y λ_{max} para ND que se muestran en la Figura 9, sugieren que el tiempo máximo de reacción al realizarse una determinación *in situ* de D o ND mediante esta técnica, podría ser no mayor a 95 minutos; ya que los tiempos de estabilización de las reacciones correspondientes para NK y NP son 240 minutos y 50 minutos; tal como lo indican las Figuras 10 y 11.

Las absorciones máximas para los productos de reacción de ND y NK se presentan a 413 nm (Figs. 9 y 10). Esto implica que existe un traslape de picos de absorción máxima de los productos de reacción ND y NK; a pesar de esto, se pueden distinguir los productos de reacción de ND y NK; puesto que las absorbancias máximas son muy diferentes: 0.357 para ND y 0.220 para NK además ocurren a tiempos muy diferentes: a los 95 min. para ND y a los 240 min. para NK. Por otro lado en la Fig.11, se puede estimar que el pico de máxima absorbancia para el producto de reacción NP debe ser menor a los 400 nm, lo cual implica que al no haber traslape con 413 nm, no se podría confundir con los productos de reacción de ND o NK.

Las Figuras 12, 13 y 14 muestran las curvas de absorción de ND, NK y NP a diferentes concentraciones. En ellas podemos ver que los picos máximos de

absorbancia se siguen manifestando a 413 nm para los productos de reacción de ND y NK, y a menos de 400 nm para NP. Esto implica que a medida que aumenta la concentración de los productos de reacción, no existen nuevas interacciones que generen nuevos cromóforos por lo menos en el intervalo de concentraciones de nuestro interés (de 5 a 40 mg/L).

En las Figs. 15, 16 y 17 basadas en las tablas VI, VII y VIII, se observa el intervalo de concentraciones en el que se mantiene cierta linealidad de la absorbancia respecto a la concentración para los productos de reacción ND, NK y NP. Este intervalo es de utilidad para establecer en un futuro, un intervalo de concentraciones en el que una prueba *in situ* podría ser confiable.

Por otro lado las curvas de absorbancias respecto del tiempo, presentadas en las figuras 18, 19 y 20 y que se basan en las tablas IX, X y XI nos dan una idea del comportamiento cinético y el intervalo en el que esta cinética tiene comportamiento aproximadamente lineal. Las figuras 21, 22 y 23 nos ilustran los intervalos de linealidad con un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.95$. Esto nos indica el intervalo en el que podríamos considerar que el desarrollo de cromóforos es aproximadamente lineal respecto del tiempo. Después de este intervalo la reacción tiene un comportamiento logarítmico en el que no se podría asegurar el valor de una concentración respecto del tiempo.

Con base en la estructura química del producto de reacción de N y P en medio alcalino que se muestra en la Figura 32, proponemos la estructura

química de NK que se muestra en la Figura 33 y la de ND que se muestra en la Figura 34.

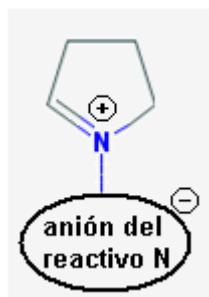


Figura 32. Producto de reacción del reactivo N + prolina en medio básico.

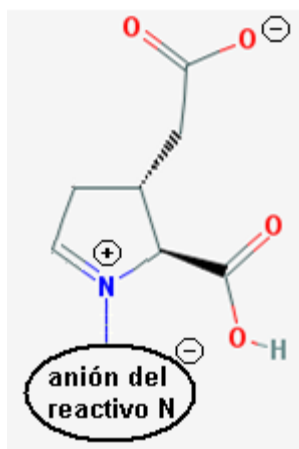


Figura 33. Producto de reacción del reactivo N + ácido kaínico en medio básico.

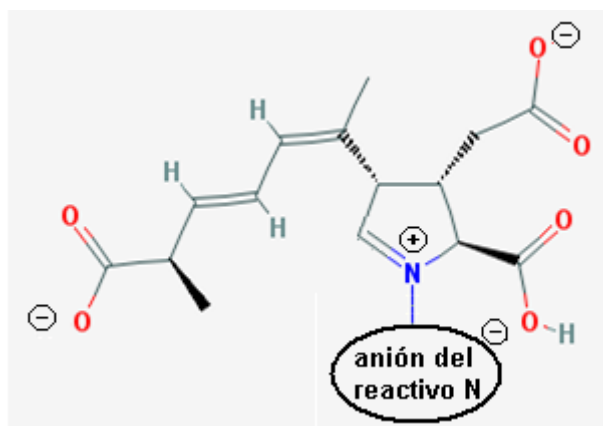


Figura 34. Producto de reacción del reactivo N + ácido domoico en medio básico..

C. Solventes preliminares

Entre los solventes preliminares que se utilizaron para hacer la primera aproximación a la polaridad de los productos de reacción se utilizaron etanol acetona, isopropanol, diclorometano, éter anhidro y hexano.

Se observó que etanol desplaza hasta un medio de la corrida cromatográfica, las manchas de los productos de reacción de ND y de N con M, mientras que una gran parte de la mancha de M permanece en el origen. Esto evidencia que etanol no es un solvente que pudiera separar francamente las manchas cromatográficas de ND y M.

Por otro lado, tanto éter como hexano son tan poco polares que todas las manchas permanecen en el origen; de esta manera etanol, éter y hexano fueron eliminados como fases potenciales de una mezcla de solventes viables para la separación.

En el caso de diclorometano (DCM), todas las manchas se barren hasta la parte media del cromatograma y no presenta definición en las manchas. Además la miscibilidad de DCM es casi nula en solventes polares; lo que dificulta el desarrollo de cromatogramas con muestras polares.

De esta manera, los únicos solventes preliminares ensayados que muestran cierto potencial de separación de manchas cromatográficas de los productos de reacción, fueron acetona (KET) e isopropanol (ISP).

Siendo KET e ISP los solventes de mayor potencial de separación, se decidió correr series de cromatogramas de productos de reacción en mezclas de diversas proporciones de isopropanol con ácido acético, y acetona con NaOH.

D. Serie isopropanol-ácido acético

Las figuras 25, 26, 27, 28 muestran una serie de cromatogramas en las que se utilizó una progresión de proporciones de ácido acético isopropanol, buscando la separación de las manchas cromatográficas. La serie de variaciones en las proporciones de ácido acético e isopropanol no logra realizar la separación de las manchas; por lo que se buscó un solvente ligeramente menos polar que isopropanol. Además, el pH podría estar jugando un papel crítico en el desarrollo de los cromatogramas; ya que los productos de reacción (Figs. 33 y 34) presentan cargas iónicas negativas susceptibles a la protonación por el ácido acético. Por estas razones se descartaron las mezclas de isopropanol y ácido acético y se decidió correr una serie de cromatogramas de productos de reacción con una mezcla de acetona y NaOH al 0.1 N para aumentar la polaridad del solvente sin potenciar la protonación de los productos de reacción.

E. Serie acetona-NaOH

La Figura 29 muestra una serie de cromatogramas en los que se utilizó diferentes proporciones de acetona y NaOH y que convergen hasta lograr una separación considerable del producto de reacción ND. La solución de acetona-NaOH(0.1 N) en una relación 1:2 (Fig. 29 E) logró separar el producto de reacción ND del resto de los productos de reacción (NK y NP) contenidos en M.

Adicionalmente en las primeras tiras cromatográficas de la Fig. 29 E) podemos observar como NK, NP y N (reactivo revelador sin reaccionar) permanecen en el punto de aplicación, mientras que ND se desplaza en el cromatograma. Esto constituye una evidencia de que la solución de acetona-NaOH(0.1 N) en una relación 1: 2 o pequeñas variaciones de ésta, podría utilizarse como punto de partida para lograr una separación definitiva o mejorar la definición de manchas de ND.

F. Productos de reacción del extracto

El aspecto de los cromóforos que se muestran en la Figura 30 nos sugiere que hay una interacción del ácido domoico adicionado al tubo ER+D, puesto que el extracto bajo reacción ER no produce el cromóforo ER+D. Por otro lado la reacción en el tubo D procede normalmente produciendo el cromóforo esperado.

G. Cromatogramas del extracto etanólico

Se corrieron cromatogramas por triplicado para el extracto de mejillón (Fig. 31) en los que se usó la solución de acetona-NaOH (0.1 N) en una relación 1:2, misma que logró separar los productos de reacción de la mezcla. Los cromatogramas muestran como hay un desplazamiento similar entre los

producto D y ER+D, mientras que el resto de las manchas permanecen en el origen.

IX. CONCLUSIONES

1. Las reacciones de las soluciones etanólicas del reactivo N al 1% con D, K y P a 20 mg/L, tienen un tiempo de estabilización de 95, 240 y 50 minutos respectivamente.
2. Los cromóforos que se produce en la reacción de las soluciones etanólicas del reactivo N al 1% con D, K y P a 20 mg/L, tienen una longitud de onda de máxima absorción a 413, 413 y <400 nm respectivamente.
3. Los cromóforos que se producen en la reacciones de las soluciones etanólicas del reactivo N al 1% con D, K y P a 20 mg/L, tienen una absorbancia máxima de 0.357, 0.220 y 0.252 a los 95, 240 y 50 minutos respectivamante.
4. Los cromóforos que se producen en la reacciones de las soluciones etanólicas del reactivo N al 1% con D, K y P a 20 mg/L, permanecen estables por 105, 150 y 5 minutos respectivamente.
5. Los coeficientes de extinción molar de los cromóforos producidos en las reacciones etanólicas del reactivo N al 1% con D, K y P, son 4596.7, 2575.4 y 1255.6 respectivamente.

6. Los intervalos de linealidad de la absorbancia respecto de la concentración para la reacciones de N al 1% con D, K y P son de 2×10^{-5} a 13×10^{-5} M, de 2×10^{-5} a 19×10^{-5} M y de 4×10^{-5} a 35×10^{-5} M respectivamente.
7. Los intervalos de linealidad de la absorbancia respecto del tiempo para la reacción de N al 1% con D, K y P son de 5 a 55 minutos, de 5 a 110 minutos y de 5 y 20 minutos respectivamente.
8. El sistema de solventes formado por acetona-NaOH(0.1 N) en una relación 1:2, separa el producto de reacción de D con N del resto de los productos de reacción en una mezcla de D, K y P o en un extracto etanólico de mejillón al que se le añadió D.
9. La plataforma cromatográfica construida de tiras de láminas de PET en la que se aplica celulosa microcristalina CMC como fase estacionaria y en la que se usa como fase móvil el sistema acetona-NaOH(0.1 N) en una relación 1:2, separa el producto de reacción de N y D en un extracto etanólico de mejillón que contiene D. Esta plataforma detecta D entre 5 mg/L y 40 mg/L en un tiempo de entre 5 y 105 minutos.

X. Literatura Citada

Altwein DM, Foster K, Doose G, Newton RT (1995) The detection and distribution of the marine neurotoxin domoic acid in the Pacific coast of the United States 1991-1993 *Journal of Shellfish Research* 14: 217-222.

Alvarez-Falconí PP (2009) Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26: 505-516.

Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, López-Cortés DJ, Núñez-Vázquez E, Hernández-Sandoval FE (2011) The actual state of the study of harmful algal blooms in Mexico *Hidrobiología* 21: 381-413.

Bargu S, Powell CL, Coale SL, Busman M, Ducette GJ, Silver MW (2002) Krill: A potential vector for domoic acid in marine food webs. *Marine Ecology Progress Series* 237: 209-216.

Bates SS, Bird CJ, Boyd RK, de Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Hanic* LA, Jamieson WD, McCulloch AW, Odense P, Quilliam MA, Sim PG, Thibault P, Walter JA, Wright JLC (1988) Investigations on the source of domoic acid responsible for the outbreak of amnesic shellfish poisoning (asp)in

Eastern Prince Edward Island. *Department of Biology, University of Prince Edward Island, Charlottetown, P.E.I., Canada, C1A 4P3.

Bates SS, Bird CJ, Freitas ASWd, Foxall R, Gilgan M, Hanic LA, Johnson GR, McCulloch AW, Odense P, Pocklington R, Quilliam MA, Sim PG, Smith JC, Rao DVS, Todd ECD, Walter JA, Wright JLC (1989) Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 46: 1203-1215.

Botana LM (2008) Seafood and freshwater toxins : Pharmacology, Physiology, and detection, Boca Raton, CRC Press.

CEN/TC275 (2008) Foodstuffs-determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection. TC275WI 00275xxx:2008 (E).

Clayden J, Read B, Hebditch KR (2005) Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. Tetrahedron 61: 5713-5724.

COFEPRIS. (2013). Mareas rojas, antecedentes en México. From <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Marea%20Roja/AntecedentesMexico.aspx>

Cortés-Altamirano R, Sierra-Beltrán A, Barraza-Guardado R (2004) Mortandad de peces debido a microalgas nocivas y tóxicas: Cinco casos de FAN en la costa continental del Golfo de California (2003-2004). COASTFISH 1^a Conferencia de Pesquerías Costeras en América Latina y el Caribe: 79-90.

de la Iglesia P, Giménez G, Diogène J (2008) Determination of dissolved domoic acid in seawater with reversed-phase extraction disks and rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry with head-column trapping. J Chromatogr A 1215: 116-124.

Dickey RW, Fryxell GA, Granade HR, Roelke D (1992) Detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid in shellfish and phytoplankton in the Gulf of Mexico. Toxicon 30: 355-359.

Douglas DJ, Kenchington ER, Bird CJ, Pocklington R, Bradford B, Silvert W (1997) Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten*

magellanicus) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseries*.

Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54: 907-913.

Edwards M, Johns DG, Leterme SC, Svendsen E, Richardson AJ (2006)

Regional climate change and harmful algal blooms in the Northeast

Atlantic. Limnology & Oceanography 51: 820.

EFSA (2009) Marine biotoxins in shellfish – domoic acid.

The EFSA Journal: 1-3.

FAO (2004a) Biotoxinas marinas FAO Food and Nutrition Papers. Rome,

<http://www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm>.

FAO (2004b) Marine biotoxins. FAO Food and Nutrition Papers. Rome, Y5486

<http://www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm>.

FDA-EPA. (2010). Fish and fishery products hazards and controls guidance.

Safety levels in regulations and guidance appendix 5. From

<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM251970.pdf>

Ferreira JG, Wolff WJ, Simas TC, Bricker SB (2005) Does biodiversity of estuarine phytoplankton depend on hydrology? *Ecological Modelling* 187: 513-523.

GEOHAB (2006) Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms HABs in Eutrophic Systems. In: Gilbert, P (Ed.). Paris and Baltimore.

Gómez-Tagle A (2007) Informe de evaluación correspondiente al mes de agosto del 2007. Componentes Inocuidad y Sanidad Acuícola. Baja California Sur, Comité de Sanidad Acuícola de B.C.S.

Hallegraeff GM, Bolch CJ (1992) Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: Implications for plankton biogeography and aquaculture. *Journal of Plankton Research* 14: 1067-1084.

Heisler J, Glibert PM, Burkholder JM, Anderson DM, Cochlan W, Dennison WC, Dortch Q, Gobler CJ, Heil CA, Humphries E, Lewitus A, Magnien R, Marshall HG, Sellner K, Stockwell DA, Stoecker DK, Suddleson M (2008) Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8: 3-13.

Hoagland P, M. Anderson DM, Kaoru Y, White AW (2002) The economic effects of harmful algal blooms in the United States: Estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries* 25: 819-837.

Homer R, Postel J (1993) Toxic diatoms in Western Washington Waters (U.S. West Coast). *Hydrobiologia* 269-270: 197-205.

INAPESCA, Alida BCS, Casimiro RC, Norberto VG. (2012). Marea roja, pesquerías y acuacultura Retrieved octubre 2, 2013, 2013, from <http://www.inapesca.gob.mx/portal/videos/archivos/mareasrojas.mp4>

IRTA, Campàs M, Dumont V, Marty JL, Caixach J. (2009). Alarmtox ensayos y bioensayos para toxinas acuáticas. Retrieved septiembre 30, 2012, 2012, from <http://www.alarmtox.net/default.asp?id=esp>

Iverson F, Truelove J, Tryphonas L, Nera EA (1990) The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E: 15-18; discussion 18-19.

Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR (2001) Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629-637.

Lefebvre KA, Robertson A (2010) Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicon* 56: 218-230.

Llewellyn L, Negri A, Robertson A (2006) Paralytic shellfish toxins in tropical oceans. *Toxin Reviews* 25: 159-196.

Lopez CB, Dortch Q, Jewett EB, Garrison D (2008) Scientific assessment of marine harmful algal blooms. Washington, D.C., Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology.

Martin JL, Haya K, Wildish DJ (1993) Distribution and domoic acid content of *Nitzschia pseudodelicatissima* in the Bay of Fundy. *Toxic phytoplankton blooms in the sea*: 613-618.

Núñez-Vázquez EJ, Gárate-Lizarraga I, Band-Schmidt CJ, Cordero-Tapia A, Lopez-Cortes DJ, Sandoval FEH, Heredia-Tapia A, Bustillos-Guzman JJ (2011) Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *Journal of Environmental Biology* 32: 413-423.

Sierra-Beltrán AP, Cruz A, Núñez E, Del Villar LM, Cerecero J, Ochoa JL (1998) An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 36: 1493-1502.

Takemoto T, Daigo K (1958) Constituents of *Chondria armata*. *Chem Pharmaceutical Bull* 6: 578-580.

Tasker RR, Doucette TA, Fernandez-Sanchez MT, Antonello N (2000) Chemical and biological detection methods. *Seafood and freshwater toxins*. CRC Press.

Todd ECD (1993) Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - a review. *Journal of Food Protection* 56: 69-83.

Vanderploeg HA, Liebig JR, Carmichael WW, Agy MA, Johengen TH, Fahnenstiel GL, Nalepa TF (2001) Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic microcystis blooms in saginaw bay (lake huron) and lake erie. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 58: 1208.

WHOI. (2007). The harmful algae page. Woods Hole Oceanographic Institution-NOAA. from <http://www.whoi.edu/redtide/human-health/medical-community-information>

Wright JLC, Falk M, McInnes AG, Walter JA (1990) Identification of isodomoic acid d and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. Canadian Journal of Chemistry 68: 22-25.

Zabka TS, Goldstein T, Cross C, Mueller RW, Kreuder-Johnson C, Gill S, Gulland FM (2009) Characterization of a degenerative cardiomyopathy associated with domoic acid toxicity in California sea Lions (*Zalophus californianus*). Vet Pathol 46: 105-119.