

## Toxinas lipofílicas en las costas de Chubut

M. Belén Mattera Coy, Mario O. Carignan, Macarena Albornoz, M. Guillermina Ruiz, Nora G. Montoya

### Resumen

En el marco de un proyecto de colaboración entre el INIDEP y la provincia de Chubut financiado por el Consejo Federal Pesquero se realizó, entre otras actividades, el análisis de toxinas por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (HPLC-MS) de un set de muestras. El objetivo fue comparar los resultados de toxicidad obtenidos por bioensayo en ratones (BR) con los que se obtienen por el método analítico autorizado por la Unión Europea. Para ello, se analizaron en el INIDEP muestras de fitoplancton y de bivalvos (almejas, mejillones y vieiras) provenientes del sistema de monitoreo de la provincia de Chubut tendientes a detectar toxinas emergentes. Los resultados fueron concordantes en todas las muestras, donde no se encontraron toxinas lipofílicas por ninguno de los dos métodos, salvo en la correspondiente a vieiras de playa Larralde, donde el análisis fue positivo por BR pero negativo por HPLC-MS



# Toxinas lipofílicas en las costas de Chubut<sup>1</sup>

M Belén Mattera Coy, Mario O Carignan, M Albornoz, M Guillermina Ruiz, Nora G. Montoya

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)

## Resumen

En el marco de un proyecto de colaboración entre el INIDEP y la provincia de Chubut financiado por el Consejo Federal Pesquero se realizó, entre otras actividades, el análisis de toxinas por cromatografía líquida con detención de espectrometría de masas (HPLC-MS) de un set de muestras. El objetivo fue comparar los resultados de toxicidad obtenidos por bioensayo en ratones (BR) con los que se obtienen por el método analítico autorizado por la Unión Europea. Para ello, se analizaron en el INIDEP muestras de fitoplancton y de bivalvos (almejas, mejillones y vieiras) provenientes del sistema de monitoreo de la provincia de Chubut tendientes a detectar toxinas emergentes. Los resultados fueron concordantes en todas las muestras, donde no se encontraron toxinas lipofílicas por ninguno de los dos métodos, salvo en la correspondiente a vieiras de playa Larralde, donde el análisis fue positivo por BR pero negativo por HPLC-MS.

## Palabras Clave

Toxinas lipofílicas de molusco, bioensayo en ratón, HPLC, espectrometría de masas

## Introducción

Las floraciones de algas nocivas son un problema cada vez más frecuente a nivel mundial que ocasiona severos daños sobre la salud pública, pérdidas económicas en acuicultura, perjuicios al turismo y episodios de mortalidad de poblaciones naturales de peces, aves y mamíferos marinos. Las ficotoxinas son clasificadas de acuerdo con sus efectos sobre la salud humana (Toxinas Paralizantes de Moluscos –TPM-, Toxinas Amnésicas de Moluscos –TAM-, Toxinas Diarreicas de Moluscos –TDM-, etc). Dentro de las TDM, el ácido okadaico (OA) y las dinophysis-toxinas (DTXs) además de producir síndrome diarreico, son promotoras tumorales (Fujiki et al. 1988). Estudios recientes sobre la epidemiología de diferentes grupos de toxinas han conducido a una clasificación diferente, basada en su solubilidad y no en sus efectos toxicológicos, así las Toxinas Diarreicas de Moluscos (TDM) ahora pertenecen al grupo de toxinas lipofílicas (TLM), junto a las yessotoxinas, pectenotoxinas, azaspirácidos y gymnodiminas (Yasumoto 2000). Estas toxinas se acumulan en los tejidos adiposos de los moluscos bivalvos, tales como mejillones, vieiras, ostras y almejas convirtiéndolos en los principales vectores de intoxicación.

Los productores de TDM son generalmente dinoflagelados del género *Dinophysis*, aunque también se determinó que el género *Prorocentrum* es capaz de producir este tipo de toxinas. Las especies de dinoflagelados marinos del género *Dinophysis* están ampliamente distribuidas en las regiones templadas y tropicales de todo el mundo, tanto en ambientes costeros como oceánicos. En la región costera de la provincia de Chubut se detectaron desde 1980 diversas especies nocivas productoras de TLM: los dinoflagelados *Dinophysis acuminata*, *D. fortii*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. tripos*, *Phalacroma rotundata*, *Prorocentrum lima* y *Protoceratium reticulatum* (Santinelli et al. 2002;

---

1

Sastre et al. 2018). Villalobos y colaboradores (2015) observaron entre 2009 y 2011 que las dos especies más frecuentes y abundantes de *Dinophysis* son *D. tripos* y *D. acuminata*, asociándolas por primera vez a la presencia de TDM detectadas por BR y a vedas en la recolección de moluscos en los golfos de Chubut.

El litoral marítimo de la Provincia de Chubut presenta condiciones geográficas y ecológicas favorables para el asentamiento de poblaciones de especies de gran interés pesquero. La extracción de moluscos bivalvos presenta un importante ingreso económico para las comunidades, ya sea a nivel regional o provincial, la cual se extiende desde productos artesanales para el consumo local, como así también a nivel masivo para el país (Álvarez et al. 2012). Por esta razón, la Provincia de Chubut mantiene operativo desde el año 1985 el Plan de Prevención y Control de Mareas Rojas (Figura 1) (Santinelli et al. 2002; Sastre et al. 2013, 2018; Ciocco 1995) que consta de un programa de identificación y cuantificación de especies nocivas de microalgas en la zona costera de esta provincia y en el cual además se analiza la dinámica espacio-temporal de las Floraciones Algales Nocivas (FAN) y la ocurrencia de toxinas paralizantes, amnésicas y lipofílicas. Dicho programa presenta dos objetivos: 1- Evitar la intoxicación humana provocada por el consumo directo de moluscos bivalvos y gasterópodos marinos conteniendo toxinas producidas por FAN (Marea Roja), en la Provincia de Chubut y 2- Optimizar la explotación comercial de las especies de moluscos presentes en la costa de la Provincia, fijando las restricciones necesarias para alcanzar el objetivo 1 (Sastre et al. 2019). Para el estudio de toxinas lipofílicas, siguiendo la legislación argentina, se realiza el bioensayo con ratón (BR) como método oficial de análisis. Las principales desventajas de este ensayo son, la falta de especificidad (no hay diferenciación entre los distintos componentes de las toxinas DSP), la subjetividad del tiempo de muerte de los animales y además, el ensayo puede resultar en falsos positivos por interferencias de ciertos lípidos (Suzuki et al. 1996). Por último, cabe mencionar que los resultados de los extractos realizados sobre el cuerpo entero y los de hepatopáncreas de los bivalvos no son uniformes y pueden resultar incorrectos para azaspirácidos (James et al. 2000). La legislación vigente en la Unión Europea establece el uso de métodos analíticos alternativos al ensayo biológico (BR) para el análisis de estas toxinas (EC-D 2002). La concentración máxima de toxinas diarreicas permitidas para el consumo, establece un nivel no mayor de 160 µg de ácido okadaico (OA) equivalente por kg de carne comestible, incluyendo como OA equivalente a las dinophysistoxinas (DTXs) y a las pectenotoxinas (PTXs) (EC-D, 2002). Para poder determinar la concentración de estas toxinas en los moluscos, se han desarrollado métodos basados en cromatografía líquida con detección por espectroscopia de masas (HPLC-MS) una técnica que presenta una alta selectividad, sensibilidad, exactitud y precisión en la identificación y cuantificación de una mezcla compleja de toxinas (MacKenzie et al. 2002). La combinación de HPLC con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS<sup>n</sup>) ha permitido estudiar un amplio rango de toxinas y descubrir nuevos análogos en muestras de diferente complejidad.

En el marco de un proyecto de colaboración financiado por el Consejo Federal Pesquero, cuyo título es: *Formación de Recursos Humanos en Programas de Monitoreo de Zonas para la Producción de Moluscos Bivalvos, nuevas apariciones de toxinas* se realizó, entre otras actividades, el estudio que aquí se presenta. Con el objetivo de comparar los resultados de toxicidad obtenidos por bioensayo en ratones con los que se obtienen por los métodos analíticos autorizados por la Unión Europea, se analizaron toxinas lipofílicas en el INIDEP en muestras de fitoplancton y de bivalvos (almejas, mejillones y vieiras) provenientes del sistema de monitoreo de la provincia de Chubut.

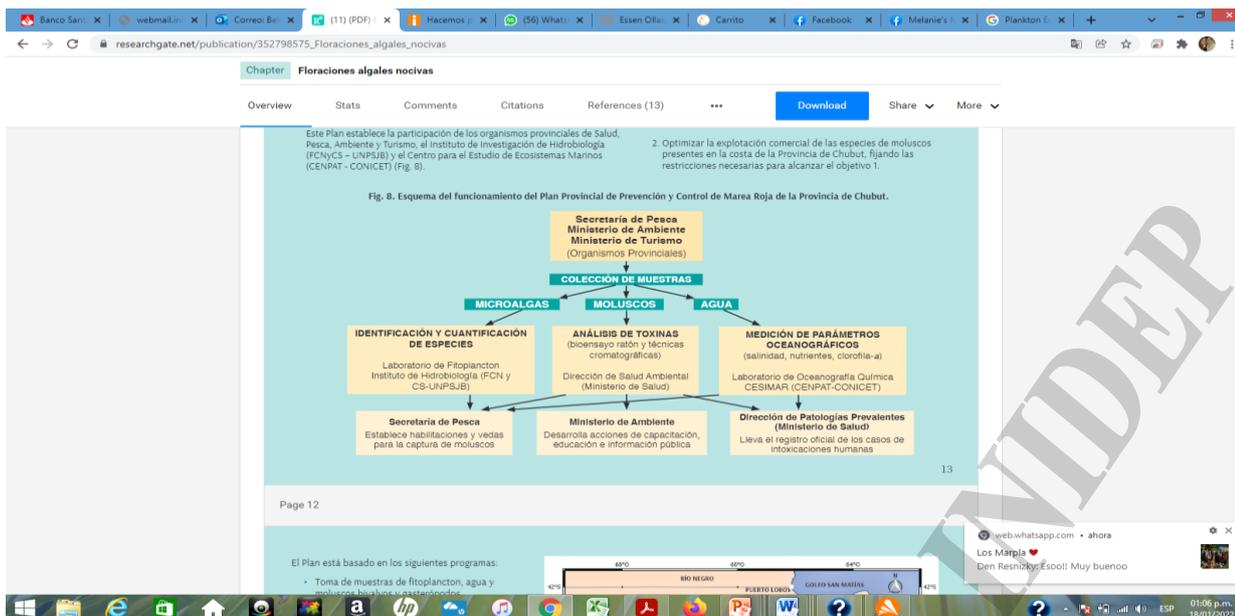


Figura 1: Esquema del funcionamiento del Plan Provincial de Prevención y Control de Marea Roja de la Provincia de Chubut (tomado de Sastre 2019).

## Materiales y métodos

Las muestras de fitoplancton y extracto de bivalvos fueron provistas por la Dra. Norma Santinelli, docente Investigadora de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, correspondientes al plan de monitoreo. Dichas muestras provenían de playa Larralde, playa Bengoa y playa Riacho (Figura 2). Se recibieron 7 extractos de bioensayo de mejillón, almeja y vieira y 8 muestras de fitoplancton (Tabla 1 y 2). Todas las muestras fueron enviadas refrigeradas al INIDEP y conservadas en frízer hasta el momento de su análisis.



Figura 2. Mapa referenciando los puntos donde se realizaron los muestreos. Playa Bengoa:  $42^{\circ}15'26''S$   $64^{\circ}05'44''O$ ; Playa Riacho:  $42^{\circ}25'35''S$   $64^{\circ}36'5''O$  y Playa Larralde:  $42^{\circ}24'47''S$   $64^{\circ}18'54''O$ .

Tabla 1. Muestras de fitoplancton colectadas, lugar y fecha del muestreo y especies de interés detectadas en las mismas. *D. acuminata*, *D. fortii* y *D. tripos* hace referencia a los dinoflagelados *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis fortii* y *Dinophysis tripos* respectivamente.

<b>Id</b>	<b>Fecha</b>	<b>Lugar de muestreo</b>	<b>Volumen filtrado</b>	<b>Especie identificada</b>	<b>Observaciones</b>
1	28/09/2020	Playa Larralde	100	<i>D. acuminata-D.fortii</i>	Filtro inadecuado
2	28/09/2020	Playa Bengoa	100	<i>D. acuminata</i>	Filtro inadecuado
3	28/09/2020	Playa Riacho	100	<i>D. acuminata</i>	Filtro inadecuado
4	18/12/2020	Playa Larralde	130	<i>D. acuminata</i>	
5	18/12/2020	Playa Bengoa	130	<i>D. acuminata- D. tripos.</i>	
6	20/01/2021	Playa Larralde	150	<i>D. acuminata</i>	
7	20/01/2021	Playa Riacho	130	<i>D. acuminata</i>	
8	12/03/2021	Playa Larralde	280	<i>D. acuminata</i>	

Tabla 2. Muestras de bivalvos colectadas, lugar y fecha de toma de muestras, resultado del bioensayo (BR).

<b>Id de muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Lugar de muestreo</b>	<b>Especie</b>	<b>Observaciones</b>
1	28/09/2020	Playa Riacho	Mejillón	BR Negativo
2	28/09/2020	Playa Riacho	Almeja	BR Negativo
3	28/09/2020	Playa Bengoa	Almeja	BR Negativo/ No llegó al INIDEP
4	18/12/2020	Playa Bengoa	Vieira	BR Negativo
5	18/12/2020	Playa Larralde	Almeja	BR Negativo
6	20/01/2021	Playa Larralde	Vieira	BR Negativo
7	20/01/2021	Playa Larralde	Vieira	BR Positivo
8	12/03/2021	Playa Larralde	Almeja	BR Negativo

Para el análisis de TDM en bivalvos (Tabla 2), se utilizaron los extractos realizados en el Laboratorio regional de Trelew para el análisis de bioensayo en ratón, según la metodología oficial. Con el objetivo de eliminar las impurezas presentes, el extracto fue filtrado con filtro de jeringa GF/F y posteriormente una alícuota del mismo fue ultrafiltrada (10KDa Ultrafree-MC). En los moluscos, las dinophysis-toxinas 1 y 2 y el ácido okadaico se encuentran generalmente en forma esterificada; por tal razón se realizó un hidrolizado en medio ácido de las muestras y un análisis adicional de las mismas, según la técnica descrita por Mountfort et al. (2001).

En el caso del fitoplancton la extracción se realizó con 4 ml de metanol, se sonicó con un equipo de ultrasonido durante 1 minuto, se repitió este procedimiento y por último se filtró con filtro de jeringa GF/F, tamaño de poro de 0,75  $\mu\text{m}$ . Tres de las muestras de fitoplancton no pudieron analizarse pues

fueron colectadas con un filtro inadecuado y por lo tanto llegaron al INIDEP sin material para el análisis.

Para la separación cromatográfica y cuantificación de las toxinas se realizó una modificación del método de detección ácido descrito por el European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EURLMB, 2011). Dicha modificación consistió en el ajuste de los tiempos de gradiente de los eluyentes para facilitar la separación de las toxinas. El sistema cromatográfico se calibró utilizando estándares de PTX2, OA, y DTX1/2 adquiridos en IMB-NRC (Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Canadá).

La detección y cuantificación de las toxinas fue realizada utilizando un espectrómetro de masas "BrukerEsquire 6000 Ion Trap". Este equipo fue operado en modo negativo (-) para la detección de Ácido Okadaico (OA); Dinophysis toxinas (DTXs) y Yessotoxinas (YTXs) y en modo positivo (+) para la búsqueda de Pectenotoxinas (PTXs), Iminas Cíclicas y Azaspirácios (AZAs). Los datos fueron adquiridos en el modo "full scan" ( $m/z$  100-900) en ambos modos de ionización (+; -), y por cromatografía de iones extraídos (EIC). Si bien se hizo un escaneo en búsqueda de todas las posibles toxinas lipofílicas, dada la presencia de dinoflagelados del género *Dinophysis* en las muestras, se hizo especial énfasis en la búsqueda de las toxinas que éstos producen. Para la detección de OA y DTXs se buscó el ion cuasimolecular  $[M-H]^-$   $m/z$  804. Para el estudio de la presencia de PTX2 se buscaron los aductos  $[M+Na]^+$   $m/z$  881,5 y  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  877 ya que ambos por su mayor estabilidad se generan en mayor abundancia que la molécula protonada. Para confirmar la presencia de toxinas en los casos sospechosos, se realizaron estudios con detección en el modo MS/MS, comparando los espectros de los estándares respectivos con las señales sospechadas de los extractos anteriormente descritos de las muestras de bivalvos y de fitoplancton, bajo las mismas condiciones de operación. La presencia de derivados del OA y de la PTX2 (DTXs, pectenotoxina seco-ácido, etc.) fue también investigada a partir de los iones principales y sus fragmentos hijos detectados en condiciones similares, aun cuando no se contó con estándares certificados de todos ellos (McNabb et al. 2005; Suzuki et al. 2001).

## Resultados

En el laboratorio de la Dirección de Salud Ambiental de Trelew, Chubut, se analizaron 8 muestras de moluscos por bioensayo, de las cuales sólo la muestra de vieira de Playa Larralde arrojó resultado positivo para TDM (Tabla 2). El estudio de las muestras de fitoplancton mostró la presencia de: *Dinophysis acuminata* en todas las muestras, *Dinophysis fortii* en la muestra 1 y *Dinophysis tripos* en la muestra 5 (Tabla 1).

Las muestras de fitoplancton estudiadas en el INIDEP (Tabla 1) fueron analizadas por cromatografía líquida-Espectrometría de masas tanto en modo positivo como negativo, arrojando todos resultados negativos para la presencia de toxinas lipofílicas (Figuras 3 y 4). Los resultados fueron comparados con los análisis de los estándares correspondientes, corroborándose que los tiempos de retención de las señales sospechosas que aparecían en las muestras analizadas no se correspondían con los de las toxinas certificadas por IMB, Canadá.



Figura 3. Cromatogramas de iones extraídos (EIC, modo positivo,  $m/z$  877) de las muestras correspondientes a los filtros de fitoplancton (A: Playa Bengoa; B: Playa Larralde 4; C: Playa Larralde 6; D: Playa Larralde 8; E: Playa Riacho). F: EIC en modo positivo de STD de PTX 2, TR: 14.5 min.

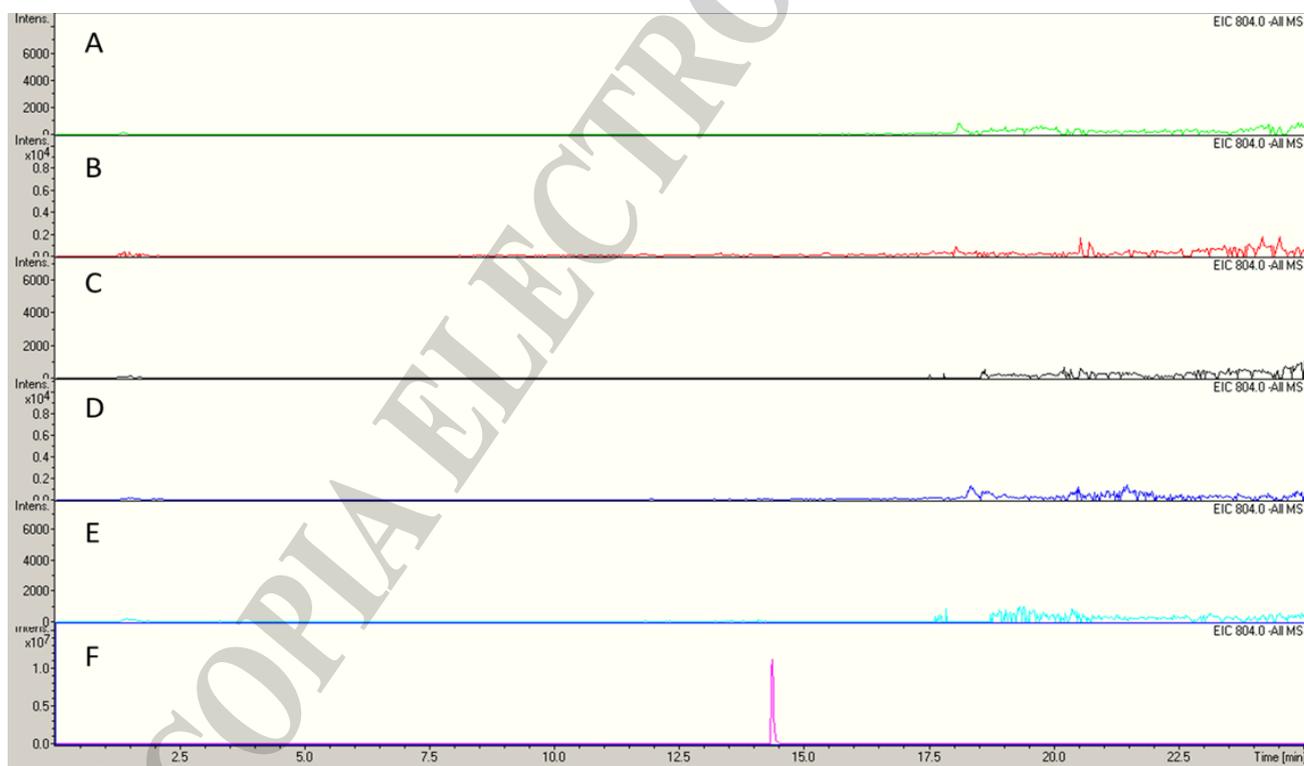


Figura 4. Cromatogramas de iones extraídos (EIC, modo negativo,  $m/z$  804) de las muestras correspondientes a los filtros de fitoplancton. (A: Playa Bengoa; B: Playa Larralde 4; C: Playa Larralde 6; D: Playa Larralde 8; E: Playa Riacho). F: EIC modo negativo de STD de AO, RT: 14.4 min.

Al igual que para las muestras de fitoplancton, se realizó un screening HPLC-MS de las muestras de moluscos enviadas (Tabla 2). En el caso de las almejas, se analizaron las 3 muestras enviadas tanto en modo positivo como en modo negativo. Además, se realizó el análisis en modo negativo de los extractos hidrolizados para la búsqueda de los ésteres de OA y DTXs. Los espectros obtenidos fueron comparados con el material de referencia certificado por el IMB, Canadá. Todas las muestras de bivalvos arrojaron resultados negativos para la presencia de toxinas lipofílicas (Figuras 5 y 6).



Figura 5. EIC modo positivo correspondientes a los extractos de almejas (A: almeja Playa Riacho 2; B: almeja Playa Larralde 5, C: Almeja Playa Larralde 8). D: EIC modo positivo del estándar de PTX2. Tiempo de retención: 14.4 min.

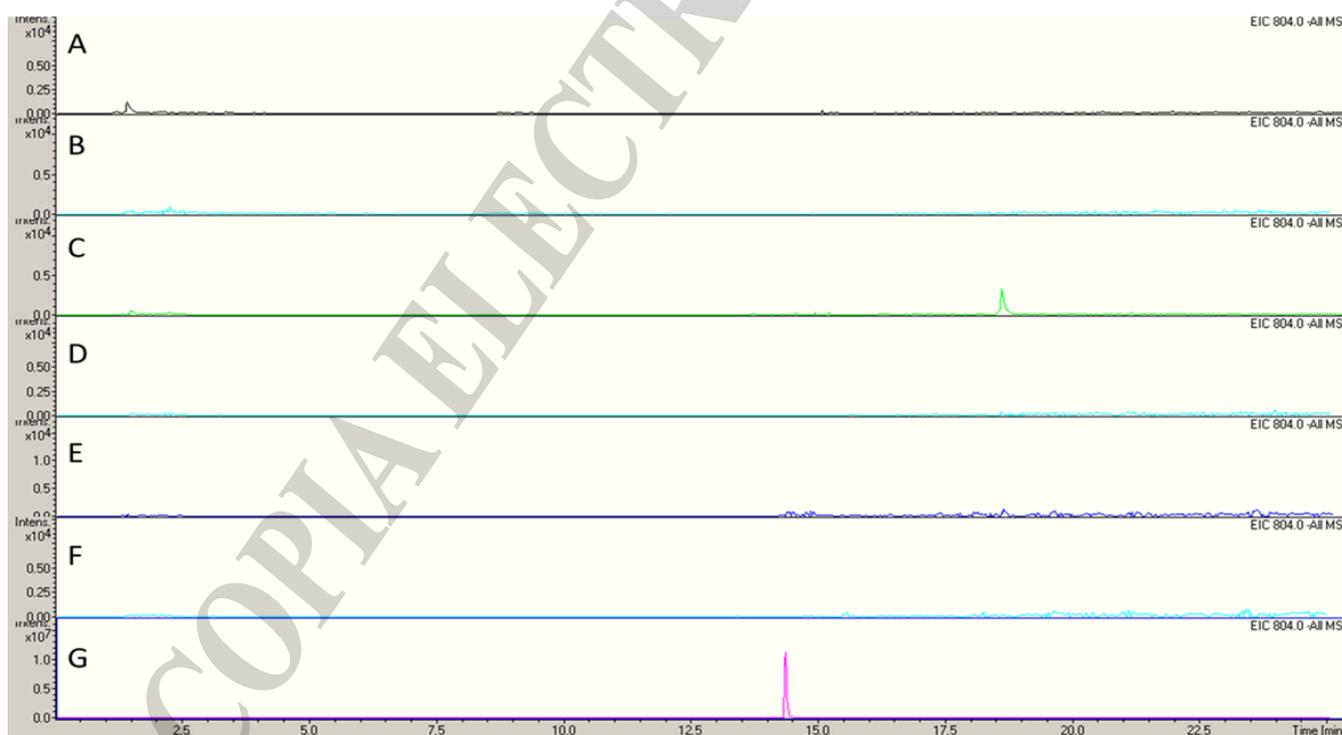


Figura 6: EIC modo negativo correspondiente a los extractos de almejas (A: Almeja Playa Riacho 2; B: Almeja Playa Riacho 2 hidrolizada; C: Almeja Playa Larralde 5; D: Almeja Playa Larralde 5

hidrolizada; E: Almeja Playa Larralde 8; F: Almeja Playa Larralde 8 hidrolizada). G: EIC modo negativo del estándar de ácido okadaico.

Los extractos de mejillones y vieiras, y sus extractos hidrolizados, fueron analizados para detectar toxinas lipofílicas, arrojando resultados negativos para la presencia de éstas. Del mismo modo que en el caso de las almejas, se compararon los cromatogramas de las muestras con la de los estándares correspondientes. (Figuras 7, 8, 9 y 10)

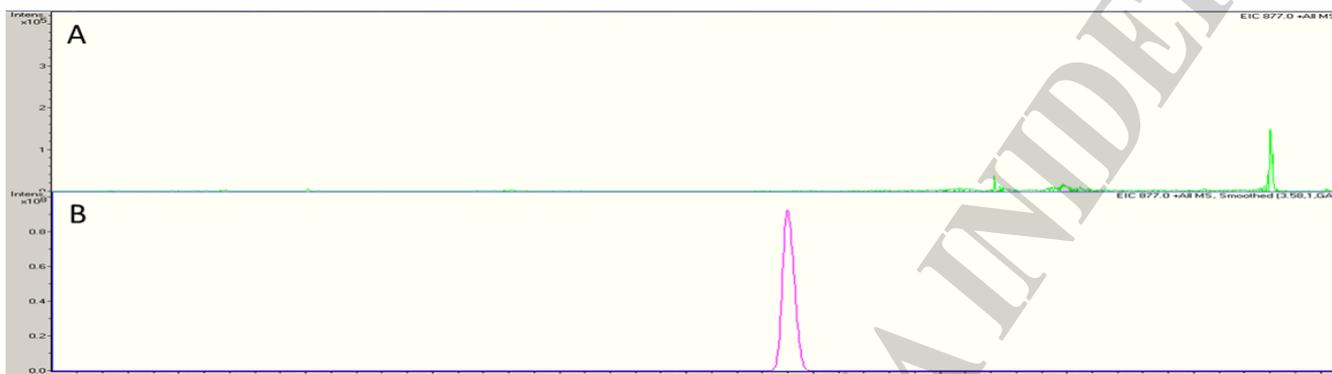


Figura 7. A: EIC modo positivo correspondiente al extracto de mejillones de Playa Riacho (verde). B: EIC en modo positivo del estándar de PTX2, TR: 14.4 min.

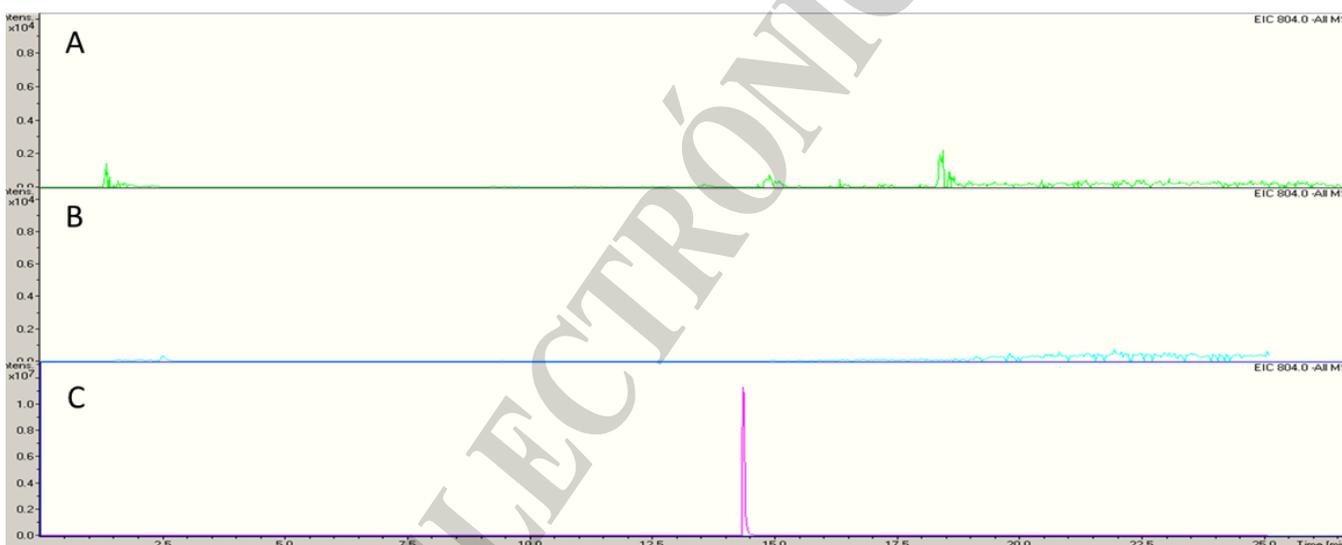


Figura 8. EIC modo negativo correspondiente al extracto de mejillones de Playa Riacho (A) y a su respectiva muestra hidrolizada (B). C: EIC modo negativo del Estándar de AO.

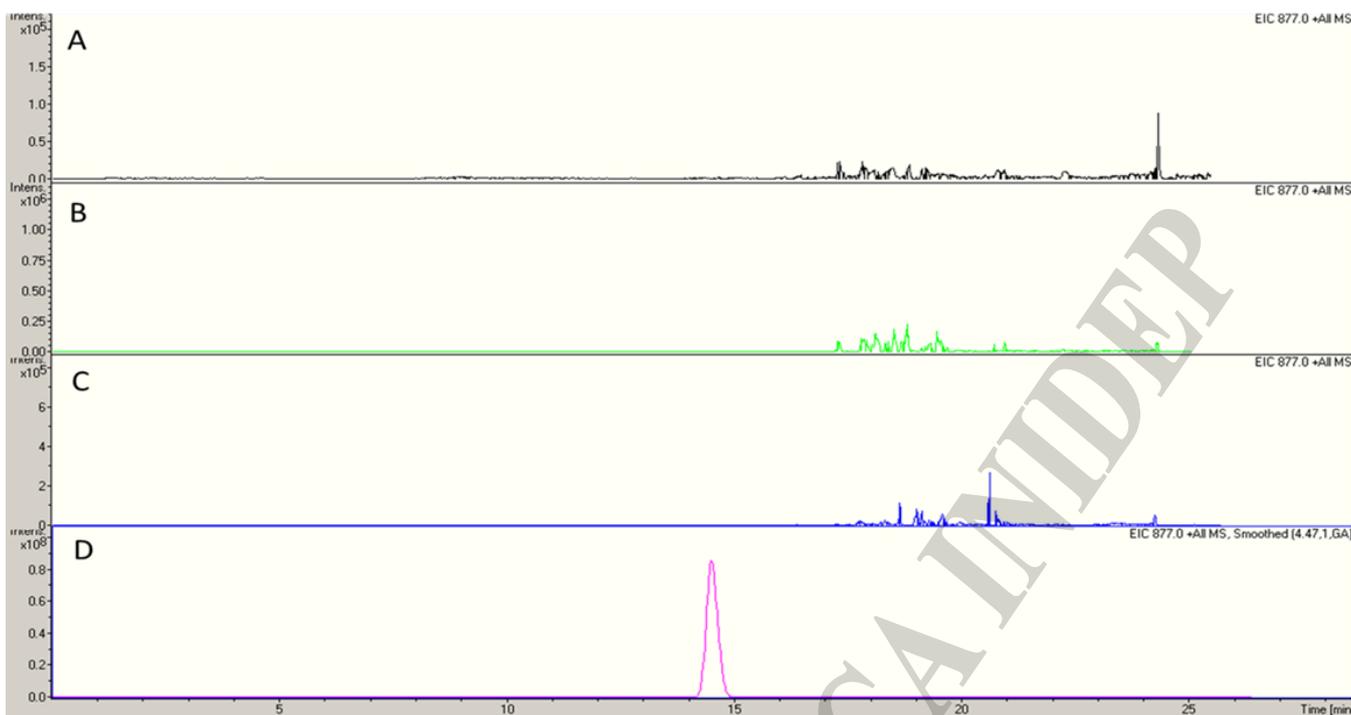


Figura 9. EIC modo positivo correspondientes a los extractos de vieiras (A: Vieira Playa Bengoa 4, B: Vieira Playa Larralde 6, C: Vieira Playa Larralde 7). D: EIC modo positivo del estándar de PTX 2, Tiempo de retención: 14.4 min.

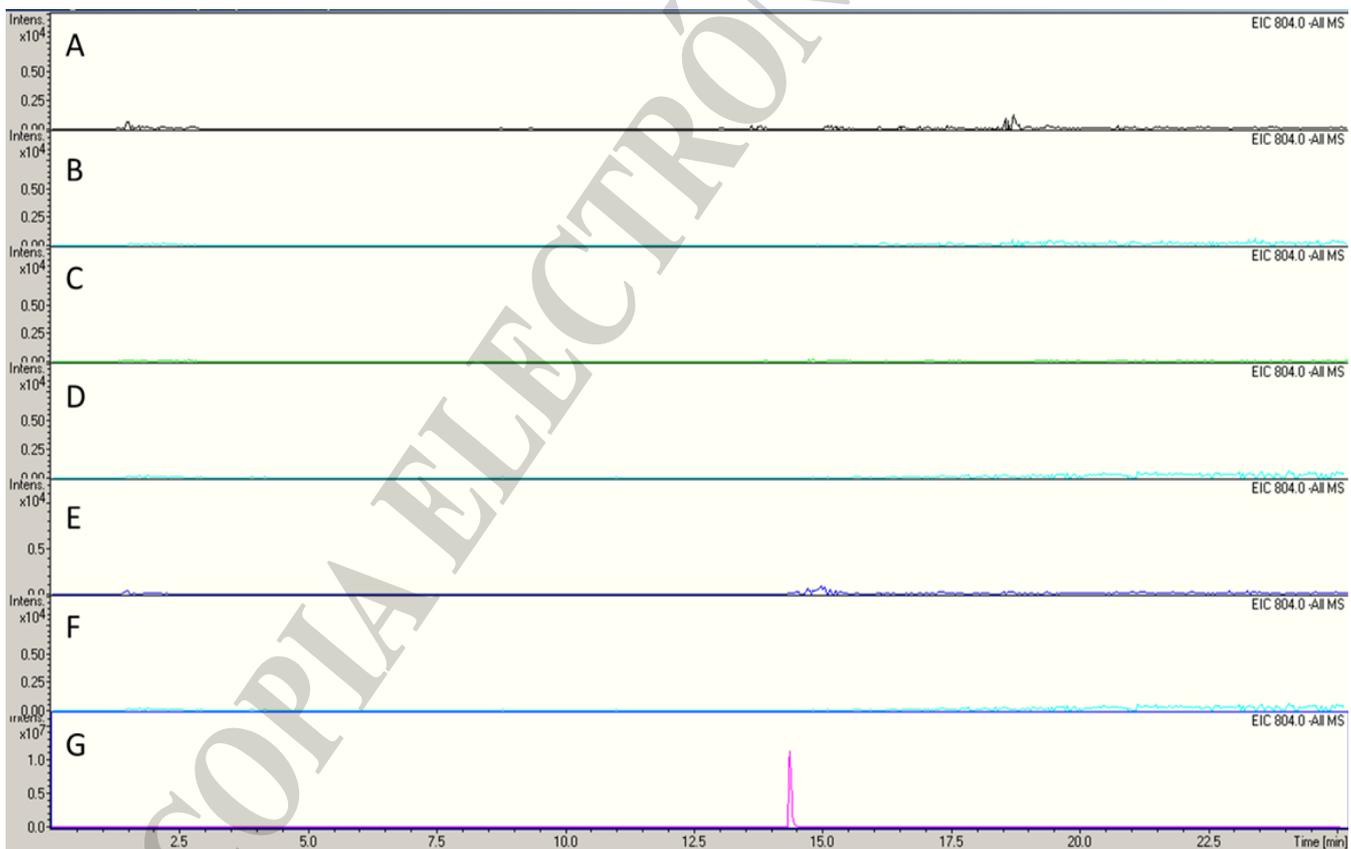


Figura 10. EIC modo negativo correspondientes a los extractos de vieiras y sus respectivas muestras hidrolizadas (A: Vieira Playa Bengoa 4; B: Vieira Playa Bengoa 4 hidrolizada; C: Vieira Larralde 6; D: Vieira Larralde 6 hidrolizada, E: Vieira Larralde 7 F: Vieira Larralde 7 hidrolizada). G: EIC en modo negativo del estándar de AO.

En las muestras cuyos EIC presentaron señales dudosas, (muestra de vieiras de playa Larralde y de mejillón de playa Riacho), se realizó un estudio de masas en tándem aislando cada ion sospechado de ser generado por una toxina del grupo estudiado y fraccionándolo para generar sus iones hijos. Este tipo de estudios da información estructural sobre el compuesto en cuestión y permite su identificación inequívoca si se compara el resultado obtenido aplicando la misma técnica a un estándar certificado. En este caso, la fragmentación producida por los iones padre no fue análoga a la fragmentación que presentaron los estándares de toxinas certificados. De este modo se puede concluir que ninguna de las muestras analizadas poseía toxinas lipofílicas. (Figuras 11, 12, 13 y 14).

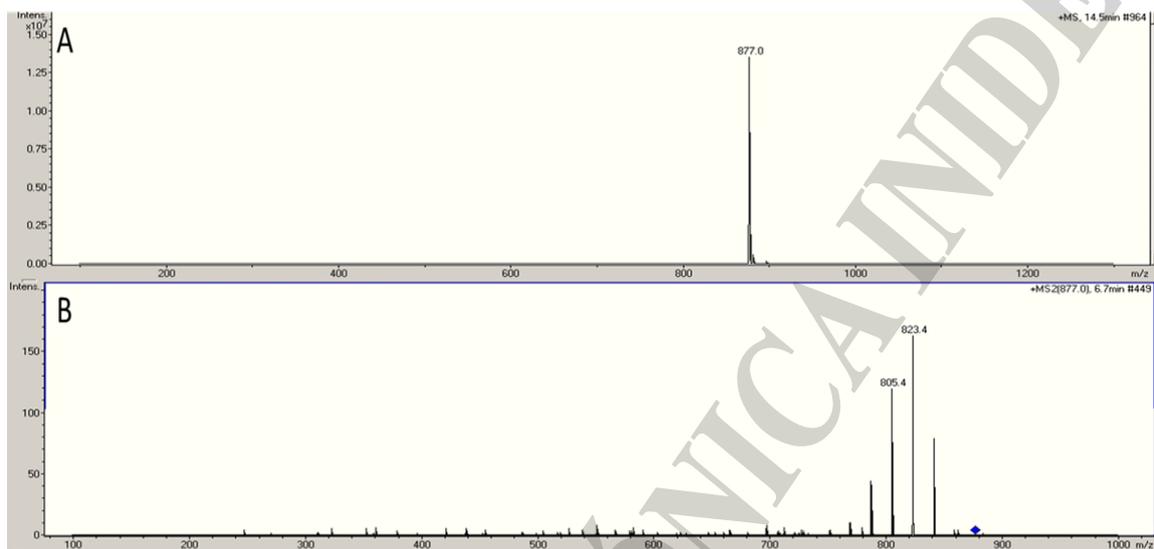


Figura 11. A: Espectro de masas MS del estándar de PTX2  $[PTX2+NH_4]^+$  ( $m/z$ )= 877. B: Espectro de masas MS/MS, el rombo azul indica la masa del ion molecular aislado y fragmentado, a la izquierda se observan las señales producto de la fragmentación de PTX2 con relaciones  $m/z$  que indican pérdidas sucesivas de agua.

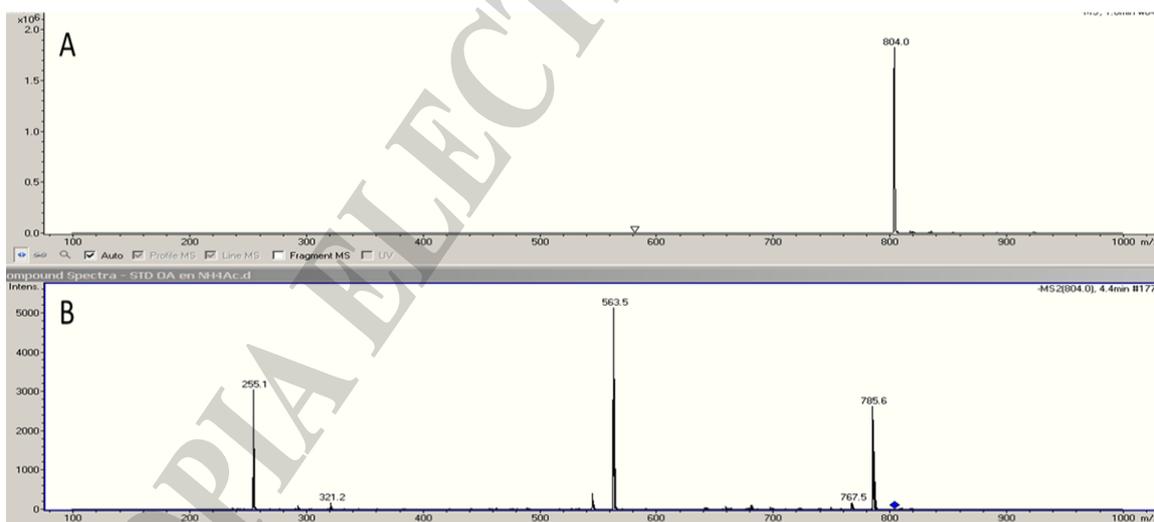


Figura 12. A: Espectro de masas MS del estándar de ácido okadaico (AO)  $[M-H]^-$  ( $m/z$ )= 803.5. B: Espectro de masas MS/MS, el rombo azul indica la masa del ion molecular aislado y fragmentado y las señales típicas de la fragmentación del ácido okadaico para este sistema:  $m/z$ = 785, 563, 255.

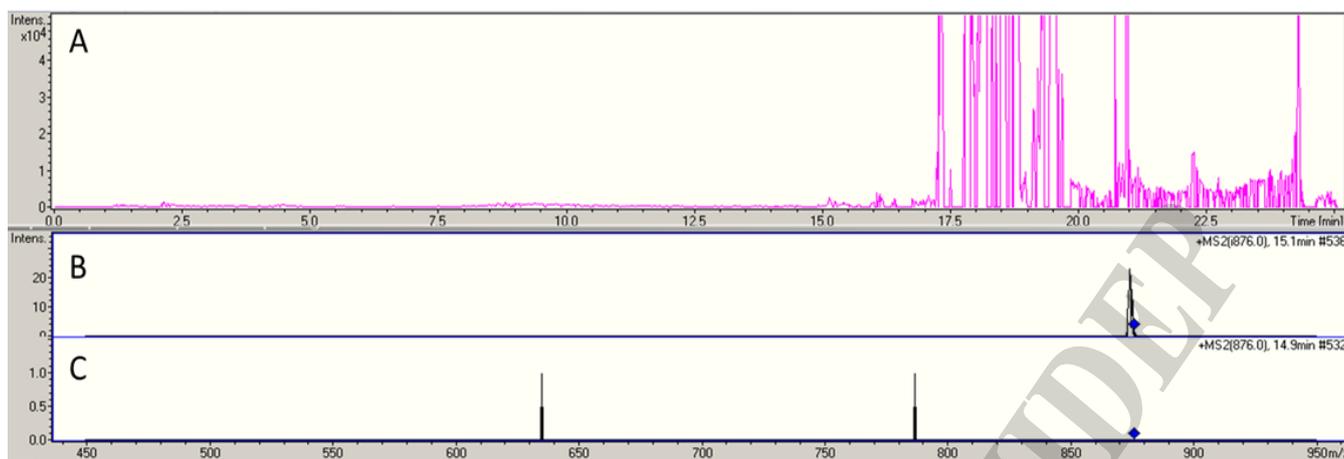


Figura 13. A: EIC modo positivo correspondientes a la muestra 6 de vieira de playa Larralde. B: Espectro de masas MS donde se aísla el ion  $(m/Z)= 877$  en la muestra 6 de vieira de playa Larralde. C: Espectro de masas MS/MS, el rombo azul indica la masa del ion molecular aislado y fragmentado, a la izquierda se observan las señales producto de la fragmentación dicho ion, donde se observa que no coinciden con los fragmentos del estándar de PTX (figura 11).



Figura 14: A: EIC modo positivo correspondientes a la muestra de mejillón de playa Riacho. B: Espectro de masas MS donde se aísla el ion  $(m/Z)= 804$  en la muestra de mejillón de Playa Riacho. C: Espectro de masas MS/MS, el rombo azul indica la masa del ion molecular aislado y fragmentado, a la izquierda se observan las señales producto de la fragmentación de dicho ion, donde se observa que no coinciden con los fragmentos del estándar de AO (figura 12).

## Discusión

Las muestras enviadas para este estudio coincidían con la presencia de *Dinophysis* en el plancton, sin embargo, ninguna tenía toxinas típicas de este género de dinoflagelados. En un estudio previo, Villalobos y colaboradores (2015) demostraron que *Dinophysis tripos* y *Dinophysis acuminata*, fueron las especies más frecuentes y abundantes encontradas en los golfos de la Patagonia Norte. Los resultados positivos del bioensayo en ratón para TDM coincidieron con abundancias relativas moderadas a altas de *D. tripos*, cuyo perfil de toxinas estaba compuesto por derivados de PTXs (Villalobos et al. 2015). Otros estudios, asociaron la detección de AO, DTXs, PTX-2 y PTX-2sa en aguas argentinas a la presencia de los dinoflagelados *D. tripos*; *D. acuminata* y *D. fortii* (Fabro et al. 2016, Krock et al. 2018, Montoya et al. 2020). En este estudio, la mayoría de las muestras sólo contenían *D. acuminata* y no fue detectado ni AO, ni sus derivados, DTXs, toxinas asociadas a

síntomas diarreicos por consumo de mariscos. Tampoco se detectó PTX ni sus derivados, toxinas lipofílicas no asociadas a intoxicaciones diarreicas, pero frecuentes en *D. tripos*, en aguas argentinas (Villalobos et al. 2015, Fabro et al. 2016, Krock et al. 2018, Montoya et al. 2011, Negri et al. 2019, Montoya et al. 2020) especie que, en el presente estudio, solo fue detectada en una de las muestras de fitoplancton. Como en otras poblaciones de dinoflagelados, el crecimiento y la producción de toxinas en *Dinophysis* están fuertemente influenciados por factores ambientales, que determinan las variaciones en frecuencia e intensidad de sus florecimientos y contenido tóxico. Se ha reportado que el contenido de toxinas en *D. acuta* y *D. acuminata* varía espacial y temporalmente en muestras naturales (MacKenzie et al. 2005; Lindahl et al. 2007). Por ejemplo, en España se observó que los moluscos bivalvos acumulan este tipo de toxinas en cantidades suficientes como para afectar al ser humano con tan solo 200 células l<sup>-1</sup> de *Dinophysis* (FAO, 2005). Por otro lado, en el Mar de Wadden (FAO, 2005) solo se asociaron con intoxicaciones las floraciones de más de 20.000 células l<sup>-1</sup> de *Dinophysis*. Fabro y colaboradores (2016) detectaron TDM asociadas a *D. acuminata* en tres expediciones oceanográficas realizadas durante el otoño, la primavera y el final del verano por el Mar Argentino, pero con una gran variabilidad en la concentración de toxina por célula entre las distintas estaciones, siendo algunas muestras no tóxicas. Esto muestra la alta diversidad en las concentraciones celulares necesarias para que los moluscos bivalvos alcancen un nivel de toxinas no apto para el consumo humano.

Si bien la mayoría de los análisis por HPLC-MS coincidieron con los de BR, realizados en el laboratorio regional de Chubut, la muestra 7 de viera de Playa Larralde dio resultados opuestos. Esta discrepancia podría explicarse por un falso positivo debido a la presencia de otros compuestos que resultaron tóxicos, por ejemplo, metales pesados o ácidos grasos presentes en las muestras (Suzuki et al. 2005). Si bien el BR permite detectar toxinas diarreicas, cabe señalar que las toxinas iminas cíclicas, como GYM y SPX, pueden causar la muerte de los animales en el bioensayo, incluso en concentraciones muy bajas (Gerssen et al. 2009). En el presente estudio, estas toxinas también fueron analizadas por HPLC-MS, arrojando resultados negativos.

Un conflicto entre dos Directivas de la UE, la 91/492 para el control de biotoxinas marinas que implementan los bioensayos en animales (European commission 1991) y la 86/609 sobre la protección de animales de laboratorio (European commission 1986), ha llevado a la Unión Europea a evitar la utilización de animales con fines analíticos, rechazando el BR y recomendando la utilización de técnicas HPLC-MS (FAO/WHO 2006, Dominguez et al. 2010, FAO/WHO 2016), sin embargo esta metodología no ha sido legislada ni es de uso corriente en los programas de monitoreo nacional.

Además de discontinuar el uso del BR para detectar toxinas lipofílicas, la EFSA (2009) recomienda la aplicación de límites reglamentarios sustancialmente más bajos para el contenido de toxinas en los productos del mar destinados al consumo humano, con la excepción de la yesotoxina. Cabe destacar que los resultados de estudios sobre el efecto no tóxico de las PTX y las YTX en ratones mediante administración oral, han llevado a un grupo de expertos a recomendar la desregulación de estos dos grupos de toxinas (FAO/WHO 2006). Como contracara de esto, los ensayos más sensibles se pueden traducir en un mayor número de cierres o cierres innecesarios de los sitios de recolección durante más tiempo. Una dificultad adicional es que se requieren recursos tanto económicos como humanos para la implementación de métodos analíticos alternativos y cambios sustanciales en la legislación, para cubrir todas las toxinas actuales y emergentes, no sólo para producción regional, sino para la importación y exportación de productos del mar. Por lo que es fundamental realizar estudios en colaboración, para poder avanzar en un mayor entendimiento de la dinámica de los florecimientos algales con lo cual se podrán realizar vedas más eficientes, asegurando un equilibrio que proteja tanto la salud pública como el desarrollo de la industria pesquera.

## Bibliografía

- ALVAREZ M, DUFFARD MVR, FERINO M. 2012. Situación actual de las Zonas productivas de moluscos bivalvos de la Provincia de Chubut. Dirección de Acuicultura, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.
- CIOCCO N. 199. Plan de manejo integrado de la zona costera patagónica- Informe técnico N°2-
- DOMINGUEZ HJ, PAZ B, DARANAS A, NORTE M, FRANCO JM, FERNÁNDEZ JJ. 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56:191–217.
- EURLMB, 2011. EU-Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs by LC–MS/MS. European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins. <http://aesn.msps.es/en/CRLMB/web/home.shtml>.
- European Commission, Council Directive 86/609/EEC, *Offic. J. Coun. Eur. Commun.* 358 (1986) 1.
- European Commission, Council Directive 91/492/EEC, *Offic. J. Coun. Eur. Commun.* 34 (1991) 15.
- European Food Safety Authority, Scientific Opinion: Marine Biotoxins in Shellfish, *EFSA J.* 1306 (2009) 4.
- FABRO, E., G.O. ALMANDOZ, M.E. FERRARIO, U. TILLMANN, A.D. CEMBELLA, B. KROCK. 2016. Distribution of *Dinophysis* species and their association with lipophilic phycotoxins in plankton from the Argentine Sea. *Harmful Algae* 59:31–41, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.09.001>
- FAO. 2005 ESTUDIO FAO: ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN Biotoxinas marinas Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1:254.
- FAO/WHO. 2006. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Fish and Fishery Products. CX/FFP 06/28/6-Add.1. Circular Letter CL 2006/45-FFP; FAO: Rome, Italy.
- FAO/WHO. 2016. Technical Paper on Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs. ISBN 978-92-5-109345-0 (FAO) ISBN 978-92-4-151148-3 (WHO).
- FAUST M A, LARSEN J, MOESTRUP O. 1999. Identification Leaflets for Plankton. Leaflet N° 88. Potentially Toxic Phytoplankton 3. Genus *Prorocentrum* (Dinophyceae). Copenhagen, Internacional Council for the Exploration of the sea.
- FAUST M A. 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *J. Phycol.*, N°31, 396 – 1003.
- FUJIKI H, SUGANUMA M, SUGURI H, YOSHIZAWA S, TAKAGI K, UDA N, WAKAMATSU K, YAMADA K, MURATA M, YASUMOTO T, SUGIMURA T. 1988. Diarrhetic shellfish toxins, DTX-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn J. Cancer Res.* 79, 1089–1093
- GERSSSEN A, MCELHINNEY M A, MULDER P P J. 2009. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394, 1213–1226.
- GESSNER BD, MCLAUGHLIN JB, BOTANA LM (Ed.). 2000. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Raton, FL, USA.
- HALLEGRAEFF G M, LUCAS I A N. 1988. The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae): photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. *Phycologia* vol. 27 (1), 25 –42.
- JAMES KJ, FUREY A, SATAKE M, YASUMOTO T. 2000. Azaspiracid Poisoning (AZP): A new shellfish toxic syndrome in Europe. Abstract for the 9th International Conference on Algal Blooms, 2000. Tasmania, Australia.
- KROCK B, FERRARIO ME, AKSELMAN R, MONTOYA NG. 2018. Occurrence of marine biotoxins and shellfish poisoning events and their causative organisms in Argentine marine waters. *Oceanography* 31:132-134.

- LEE J S, IGARASHI T, FRAGA S, DHAL E, HOVGAARD P, YASOMOTO T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, 1, 147-152.
- LINDAHL O, LUNDVE B, JOHANSEN M. 2007. Toxicity of *Dinophysis spp.* in relation to population density and environmental conditions on the Swedish west coast. *Harmful Algae* 6, 218–231.
- MACKENZIE L, BEUZENBERG V, HOLLAND P, MCNABBA P, SUZUKI T, SELWOOD A. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4, 75–85.
- MACKENZIE L, HOLLAND P, MCNABB P, BEUZENBERG V, SELWOOD A, SUZUKI T. 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MC/MS analysis. *Toxicon* 40, 1321–1330.
- MCNABB P, SELWOOD A I, HOLLAND P T. 2005. Multiresidue methods for determination of algal toxins in shellfish: single-laboratory validation and interlaboratory study. *J. AOAC Inter.* Vol 88, 761-772.
- MONTOYA, N.G., H.R. BENAVIDES, AND M.O. CARIGNAN. 2011. Determinación de ácido okadaico y primera detección de pectenotoxinas asociada a la presencia de *Dinophysis* en el litoral argentino. Comisión Técnica Mixta Del Frente Marítimo. Décimosexto Simposio Científico Buenos Aires, 1 al 4 de noviembre de 2011.
- MONTOYA N.; CARIGNAN M; MATTERA MB. 2020. Toxinas Algales en el Mar Argentino: nuevos hallazgos, nuevos desafíos”. Nora Montoya. *Acta Toxicológica Argentina* Vol 28 (3)
- NEGRI R, SILVA R, MONTOYA N, CARIGNAN M. 2019. Distribución diferencial de los dinoflagelados tóxicos *Dinophysis acuminata* y *D. tripos* en la Estación Permanente de estudios Ambientales (EPEA) en el período 2000-2019: una señal del cambio climático? XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar-COLACMAR 4-8 Noviembre, Mar del Plata, Argentina
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. 2002. Decision2002/255/EC 62-64. L 75/62, 16.3
- SANTINELLI N, SASTRE V, ESTEVES JL. 2002. Episodios de algas nocivas en la Patagonia Argentina.
- SANTINELLI N, SASTRE V, ESTEVES JL. 2002. Episodios de algas nocivas en la Patagonia Argentina. En: SAR EA, FERRARIO ME, REGUERA B (eds.) *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, cap. 8: 197-208.
- SASTRE A V, SANTINELLI N H, WILLERS V, SOLÍS M E, DÍAZ OVEJERO S, PÉREZ LB, PÉREZ A A, FAJARDO M A, GRACIA VILLALOBOS L, MARINO G R. 2013. Floraciones de *Alexandrium tamarense* y TPM en el Golfo San Jorge. XXIV Jornadas Argentinas de Botánica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 48 (Supl.): 175-176.
- SASTRE V, SANTINELLI N, FERRARIO M. 2019. Floraciones algales nocivas. En: MICROALGAS MARINAS TÓXICAS EN AGUAS COSTERAS DE LA PROVINCIA DE CHUBUT. Publisher: Fondo Federal Pesquero.
- SASTRE V, SANTINELLI N, SOLÍS M, PEREZ L, OVEJERO S, GRACIA VILLALOBOS L, CADAILLÓN A D'AGOSTINO V. 2018. Harmful Marine Microalgae in Coastal Waters of Chubut (Patagonia, Argentina) In: HOFFMEYER MS, SABATINI ME, BRANDINI FP, CALLIARI DL, SANTINELLI NH (eds.). *Plankton Ecology of the Southwestern Atlantic. From the Subtropical to the Subantarctic Realm* Springer: 495-515.
- SUZUKI T, JIN T, SHIROTA Y, TADASHI M, YUTAKA O, TAKASHI K. 2005. Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. *Fish Sci* 71, 1370.

SUZUKI T, MACKENZIE L, STIRLING D, ADAMSON J. 2001. Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop *Pecten novaezelandiae*. Fish. Sci. 67, 506–510

SUZUKI T, YOSHIZAWA R, KAWAMURA T, YAMASAKI M. 1996. Interference of Free Fatty Acids from the Hepatopancreas of Mussels with the Mouse Bioassay for Shellfish Toxins. Lipids 31 (6): 641-645.

TAYLOR FJR, FUKUYO Y, LARSEN J, HALLEGRAEFF G M. 2003. Taxonomy of harmful dinoflagellates. En: Manual of harmful marine microalgae. Eds.: HALLEGRAEFF G M, ANDERSON D M Y CEMBELLA AD. UNESCO, France. 389 – 432.

VILLALOBOS LG, SANTINELLI N, SASTRE V, KROCK B, ESTEVES JL. 2015. Dinophysis Species Associated with Diarrhetic Shellfish Poisoning Episodes in North Patagonian Gulfs (Chubut, Argentina) J. of Shellfish Research, 34(3):1141-1149 (2015). <https://doi.org/10.2983/035.034.0339>

YASUMOTO T. 2000. Historic considerations regarding seafood safety In Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection; BOTANA L M, Ed. Dekker: New York, pp 1-17.

COPIA ELECTRÓNICA LIBRE