

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS**  
**NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES TÓXICOS DE TOXINAS  
LIPOFÍLICAS (VDM) Y TOXINAS PARALIZANTES (VPM) EN  
INVERTEBRADOS MARINOS COLECTADOS EN LAS ISLAS  
HUICHAS, REGIÓN DE AYSÉN, CHILE.

TESIS

RUBÉN ARMANDO ZAMORANO GAJARDO

2011

# RUBÉN ARMANDO ZAMORANO GAJARDO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para obtener el título profesional de Biólogo Marino.

## COMISIÓN DE TÍTULO:

---

Carlos García Mansilla

**Director de Tesis**

Universidad de Chile

---

Néstor Lagos Wilson

**Miembro de la Comisión**

Universidad de Chile

---

Sergio Avaria Placier

**Miembro de la Comisión**

Universidad de Valparaíso

## TABLA DE CONTENIDO

	<b><u>Página</u></b>
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMEN	XXII
INTRODUCCIÓN	1
Floraciones de Algas Nocivas en Chile	5
Veneno Paralizante de Moluscos (VPM)	5
Veneno Diarreico de Moluscos (VDM)	9
7-O-acyl derivados de DTX-1	12
Toxinas lipofílicas asociadas al Veneno Diarreico de Moluscos (VDM)	14
Azaspirácidos (AZA)	14
Pectenotoxinas (PTX)	18
Yessotoxinas (YTX)	22
Métodos de detección de las toxinas diarreicas, lipofílicas y paralizantes	25
Bioensayo de ratón	26
Cromatografía líquida de alta resolución con detección Fluorescente en línea (HPLC-FLD)	27
Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS)	27
OBJETIVOS	30
Objetivo general	30

Objetivos específicos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Recolección de muestras	31
Preparación de muestras para aislación de toxinas lipofílicas	34
Preparación de Solución mix de Estándares	34
Análisis de las muestras mediante LC-MS/MS	35
Análisis de cromatogramas y espectros/identificación de señales	36
Preparación de extractos para el análisis de toxinas paralizantes (VPM)	37
Análisis del Veneno Paralizante de Moluscos mediante HPLC-FLD	37
Determinación de las concentraciones de las toxinas del VPM	38
RESULTADOS	39
Toxinas Paralizantes	39
Perfil de toxinas paralizantes en bivalvos	45
<i>Venus antiqua</i> (Almeja)	45
<i>Aulacomya ater</i> (Cholga)	48
<i>Mytilus edulis chilensis</i> (Chorito)	51
<i>Choromytilus chorus</i> (Choro Zapato)	53
<i>Gari solida</i> (Culengue)	56
<i>Tagelus dombeii</i> (Navajueta)	59
Perfil de toxinas paralizantes en Gasterópodos	61
<i>Concholepas concholepas</i> (Loco)	61
<i>Argobuccinum ranelliforme</i> (Caracol del sur)	64
Perfil de toxinas paralizantes en crustáceos	
<i>Austromegabalanus psittacus</i> (Picoroco)	67

Toxinas Lipofílicas	68
Perfil de toxinas lipofílicas en Bivalvos	72
<i>Venus antiqua</i> (Almeja)	72
<i>Aulacomya ater</i> (Cholga)	75
<i>Mytilus edulis chilensis</i> (Chorito)	78
<i>Choromytilus chorus</i> (Choro zapato)	79
<i>Gari solida</i> (Culengue)	82
<i>Tagelus dombeii</i> (Navajueta)	85
Perfil de toxinas lipofílicas en Gasterópodos	86
<i>Concholepas concholepas</i> (Loco)	86
<i>Argobuccinum ranelliformes</i> (Caracol del Sur)	90
Perfil de toxinas lipofílicas en crustáceos	
<i>Austromegabalanus Psittacus</i> (Picoroco)	95
DISCUSIÓN	97
Toxinas Paralizantes	97
Toxinas lipofílicas	99
CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS	106

## AGRADECIMIENTOS

Desde que era niño siempre les decía a mis padres que yo sería un Biólogo Marino y mi Padre me decía “*que vas a estudiar eso si nadie sabe lo que es*” y aquí estoy en la última etapa para conseguir un sueño que persigo desde los 5 años.

En primer lugar debo dar gracias a Dios por su infinita misericordia que tuvo conmigo, El siempre me guardo, me ayudo y me dio todo lo necesario hasta el más mínimo detalle para llegar hasta este momento. No hay palabras para expresar mi gratitud, porque todo lo que tengo, lo que soy y lo que puedo llegar a ser se lo debo todo a EL, porque es digno de toda honra, gloria y suprema alabanza.

Gracias también le doy a mis padres por todo su apoyo incondicional, por todo su esfuerzo y su sacrificio, que me ha ayudado hasta el día de hoy, tan solo ellos saben todo lo que los quiero y los amo, así que esta tesis está dedicada a ellos.

A mis hermanos Patricio, Cristian, Patricia y María Isabel los que me dieron fuerza, y me ayudaron de muchas formas, les estoy muy agradecido.

A mi amigo Jhon Quintanilla, por haber estado conmigo durante esos 5 años de Universidad en el que se convirtió más que un amigo, en un hermano. A

su polola Grimanesa y a sus Padres Sofía y Patricio a los que les estoy muy agradecido, porque me brindaron un hogar donde quedar y su amistad.

A mis amigos de carrera, en especial a Guido, Celeste, Daniela, David, Priscila, Pamela, Gabriela, Lily, Karla y Montserrat, cada uno de ellos me brindaron su amistad. Juntos pasamos muchos momentos de felicidad, angustia y son parte importante dentro de mi formación profesional y personal.

A mi tía Cecilia, a mi tío Gamalier, a la Beny, la Nico y la abuelita que me abrieron las puertas de su casa sin condiciones y las puertas de su corazón, que me trataron como a un hijo y un hermano, a ellos también les debo mucho, porque me hospedaron mientras estuve en Santiago.

A Cindy Costa, por ayudarme a contactar con mi profesor guía y por enseñarme muchas cosas, al igual que su hermano Christian Costa el que, también fue un gran amigo y compañero.

Al Doctor Néstor Lagos por sus incontables consejos, por abrir nuevos horizontes y por toda la experiencia que me transmitió durante los meses en que estuve en su laboratorio.

Al profesor Sergio Avaria que me instruyó durante la carrera y por su buena disposición, atención y su apoyo en este proceso.

Al Doctor Andrés Barriga el que me ayudó con el análisis de las muestras en el HPLC-MASA y por compartir sus conocimientos.

A mis amigos de laboratorio Cristóbal Contreras y Diego Figueroa los que me ayudaron en el laboratorio en todo lo que necesite, y con los que compartimos gratos momentos, por su amistad y más que amigos los quise como mis hermanos, apapa!!!!.

Y a todos mis profesores de la Universidad, funcionarios y a todas las personas que hicieron posible que llegara hasta aquí.

Gracias a todos por todo y que Dios les bendiga.

Esta tesis ha sido desarrollada y financiada a través del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT, proyecto N° 1090058: PRODUCTION OF REFERENCE MATERIAL FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF DINOPHYSISTOXIN-3 TOXIN, A DERIVATE OF DINOPHYSISTOXIN-1, THE MOST POTENT DIARRHETIC TOXIN. PURIFICATION FROM CONTAMINATED SHELLFISH.

## LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
1. Niveles máximos y métodos de detección de las toxinas marinas. (Programa Nacional Integrado de Marea Roja o Floraciones algales Nocivas 2010).	25
2. Zonas, lugares y ubicación (GPS) de las 35 estaciones de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén.	33
3. Toxicidad del VPM en el universo de muestras recolectadas en Islas Huichas, expresadas en $\mu\text{g STX eq}/100 \text{ g}$ .  SEM = Error estándar, N = n° de muestras.	43
4. Perfil de toxinas y toxicidades de <i>Venus antiqua</i> recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).  Toxicidad total expresada en $\mu\text{g STX eq}/100 \text{ g}$ .	45

- 5.** Perfil de toxinas y toxicidad de *Aulacomya ater*
- recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).
- Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 48
- 6.** Perfil de toxinas y toxicidad de *Mytilus edulis chilensis*
- recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).
- Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 50
- 7.** Perfil de toxinas y toxicidades de la especie *Choromytilus chorus*
- recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).
- Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 53
- 8.** Perfil de toxinas y toxicidad de *Gari solida*
- recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).
- Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 56

- 9.** Perfil de toxinas y toxicidad de *Tagelus dombeii*  
recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de  
Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).  
 $\mu\text{g STX eq/100 g}$ . 58
- 10.** Perfil de toxinas y toxicidad de *C. concholepas*  
recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de  
Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).  
Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g STX eq/100 g}$ . 61
- 11.** Perfil de toxinas y toxicidad de *Argobuccinum ranelliforme*  
recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector  
de Islas Huichas, región de Aysén  
(n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g STX eq/100 g}$ . 64
- 12.** Perfil de toxinas y toxicidad de *A. psittacus* recolectadas en  
las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas,  
región de Aysén (n.d = no detectada).  
Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g STX eq/100 g}$ . 66

- 13.** Parámetros para la determinación de Toxinas lipofílicas mediante LC-MS/MS. 67
- 14.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Venus antiqua* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén . n.d. = no detectada. Valores expresados en µg/Kg. 72
- 15.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Aulacomya ater*, recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg. 75
- 16.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Mytilus edulis chilensis* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg. 77

- 17.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Choromytilus chorus* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d. = no detectada).  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 78
- 18.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Gari solida* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d. = no detectada).  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 82
- 19.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Tagelus dombeii* colectada en Isla Luchín, sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 84
- 20.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Concholepas concholepas* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d. = no detectada).  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 86

- 21.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Argobuccinum ranelliformes* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d. = no detectada).  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 90
- 22.** Perfil de toxinas lipofílicas en *A. psittacus* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, región de Aysén (n.d = no detectada).  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 94
- 23.** Lugares de muestreo, especie y máxima concentración de PTX-2 encontrada en las muestras de Islas Huichas, Región de Aysén.  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 100
- 24.** Lugares de muestreo, especie y máxima concentración de YTX encontrada en las muestras de Islas Huichas, Región de Aysén.  
Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ . 101

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Estructuras químicas del las toxinas del Veneno Paralizante de Moluscos (VPM).	6
2. Microscopía óptica de: A. <i>Dinophysis acuta</i> y B. <i>Dinophysis Acuminata</i> . La barra corresponde a 10 micrones	10
3. Estructura química del AO y sus derivados.	11
4. Estructura química y plegamiento de DTX-1 y DTX-3	13
5. Estructura química de las 6 toxinas predominantes de Azaspirácidos.	16
6. Estructura química de Pectenotoxinas (PTXs) y análogos.	20
7. Estructura química de Yessotoxina (YTX).	23
8. Zonas de evaluación y muestreo Sector Islas Huichas, Puerto Aguirre. Los números asignados en el mapa, identifican cada estación de muestreo.	32
9. Cromatograma de HPLC-FLD del estándar de isómeros de Toxinas paralizantes neoSTX ( $R_T$ : 8,5) y STX ( $R_T$ : 12,5).	40

- 10.** Cromatograma HPLC-FLD del estándar de las toxinas paralizantes GTX-4 ( $R_T$ : 8,6), GTX-1 ( $R_T$ : 10,1), GTX-5 ( $R_T$ : 12,3), GTX-3 ( $R_T$ : 14,2), GTX-2 ( $R_T$ : 17,8). 40
- 11.** Cromatograma HPLC-FLD de una muestra de *Gari solida* (rojo) y *Austromegabalanus psittacus* (negro), positivo a GTXs, obtenidas desde el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. 41
- 12.** Porcentaje de abundancia de las especies recolectadas en Islas Huichas, Región de Aysén. 42
- 13.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Venus antiqua*, de concentración promedio de 453  $\mu\text{g}$  STX eq /100 g. 47
- 14.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Aulacomya ater* con una concentración promedio de 423  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 50
- 15.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Mytilus edulis chilensis* con un valor promedio de 1.138  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 52

- 16.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Choromytilus chorus* con una concentración promedio de 55  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 55
- 17.** Perfil tóxico promedio cuantitativo y cualitativo de toxinas paralizantes en *Gari solida* con una toxicidad promedio de 2.505 $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 58
- 18.** Perfil tóxico de toxinas paralizantes determinada en *Tagelus dombeii* colectada en Isla Luchín (45.044544s, 73.422865w), con una toxicidad total de 99  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 60
- 19.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Concholepas concholepas* cuya toxicidad total es de 205  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. 63
- 20.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Argobuccinum ranelliforme* con una concentración

	promedio de 1.850 µg STX eq /100 g.	66
<b>21.</b>	Cromatograma LC-MS/MS de la solución mix de estándares de toxinas lipofílicas AO, YTX, PTX-2, AZA-1 y DTX-1.	69
<b>22.</b>	Cromatogramas LC-MS/MS de los estándares de toxinas lipofílicas AO, YTX, PTX-2, AZA-1 y DTX-1 por separado.	70
<b>23.</b>	Espectros de masa de la solución mix de estándares de toxinas lipofílicas AO, YTX, PTX-2, AZA-1 y DTX-1.	71
<b>24.</b>	Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en <i>Venus antiqua</i> , en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 56 µg AO eq/Kg y 1,0 µg YTX/Kg.	74
<b>25.</b>	Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en <i>Aulacomya ater</i> , en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 76 µg AO eq/Kg y 18 µg YTX/Kg.	77

- 26.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Choromytilus chorus*, en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 156,1  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg y 16,4  $\mu\text{g}$  YTX/Kg. 80
- 27.** Espectro de masa de YTX de la muestra de *Choromytilus chorus* colectada desde Isla Herraduras. 81
- 28.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Gari solida*, en el sector de Isla Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 58,9  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg y 2,8  $\mu\text{g}$  YTX/Kg. 84
- 29.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas detectadas en *Concholepas concholepas* recolectadas en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 39,5  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg, 12,8  $\mu\text{g}$  YTX/Kg. 88
- 30.** Cromatograma de LC-MS/MS obtenida desde *Concholepas concholepas* recolectadas en Isla Atenais (zona 29). 89

- 31.** Espectro de masa de AO y DTX-1 obtenidos desde la muestra de *Concholepas concholepas* correspondiente a Isla Atenais (zona 29). 89
- 32.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Argobuccinum ranelliforme*, en el sector de Isla Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 25 µg AO eq/Kg y 5,0 µg YTX/Kg. 92
- 33.** Cromatograma de LC-MS/MS de la muestra de *A. ranelliformes* provenientes de Islote la Garza, sector Islas Huichas. 93
- 34.** Espectro de masas de AO y DTX-1 de la muestra de *A. ranelliformes* provenientes de Islote la Garza, Sector de Islas Huichas 94
- 35.** Perfil de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Austromegabalanus psittacus*, en el sector de Isla Vergara. Toxicidad total de 71 µg AO eq/Kg. 96

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron las toxinas del VPM (STX, neoSTX, GTX-4/GTX-1, GTX-5 y GTX-3/GTX-2) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección fluorescente en línea (HPLC-FLD), y toxinas Lipofílicas (AO y DTX-1, AZA-1, PTX-2 y YTX) por medio de cromatografía líquida con espectrometría de masa (LC-MS/MS) a 91 muestras recolectadas en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. Las especies estudiadas correspondieron a un total de 9 invertebrados marinos correspondientes a: *Venus antiqua*, *Aulacomya ater*, *Gari solida*, *Mytilus edulis chilensis*, *Choromytilus chorus*, *Tagelus dombeii*, *Concholepas concholepas*, *Argobuccinum ranelliformes* y *Austromegabalanus psittacus* a los cuales se les determinó sus perfiles tóxicos y concentraciones de las toxinas presentes.

Los resultados obtenidos de las toxinas constituyentes del VPM evidenciaron que el 82,4% del total de muestras analizadas sobrepasaron el límite permitido establecido como norma sanitaria de 80 µg STX eq/100 g de carne de molusco, identificándose a la especies *Gari solida* y *Argobuccinum ranelliformes* con los niveles tóxicos más altos dentro del análisis, correspondientes a 7.092 µg STX eq/100 g y 4.955 µg STX eq/100 g respectivamente.

El perfil de toxinas paralizantes estuvo dominado por las Gonyautoxinas (GTXs) de las cuales los epímeros GTX-3/GTX-2 correspondieron al 93,4% del

total de las toxinas analizadas, seguidos por GTX-5 en un 89,6% y GTX-4/GTX-1 con un 54,2%.

En el caso de las toxinas lipofílicas se logró determinar la presencia de AO, DTX1, AZA-1, PTX-2 y YTX mediante LC-MS/MS en las muestras de invertebrados marinos. De todas las toxinas analizadas AZA-1 fue la que se presentó en un mayor número de muestras (61,5%), seguido por YTX-1 (41,8%), DTX-1(29,7%) y finalmente AO y PTX-2 ambas con un 26,4%. Sin embargo, la toxina que se detectó en mayor concentración correspondió a DTX-1 con valores promedio de 345,7 µg/kg (*Choromytilus chorus*), toxina que en la mayoría de los casos se identificó junto al isómero de AO en los perfiles analizados.

Se determinó la presencia simultánea de toxinas paralizantes y toxinas lipofílicas dentro de un mismo recurso. Además, se detectó la presencia de nuevas toxinas (AZA-1, PTX-2 y YTX) en recursos a los que nunca se les había asociado toxinas de este tipo, revelando el potencial riesgo para la salud de las personas y las actividades económicas asociadas a la extracción de recursos marinos, por lo que es necesario el inicio de nuevos estudios para la determinación de estas toxinas y la fiscalización de las especies en explotación.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas del plancton son parte importante de los ecosistemas marinos a nivel mundial, pues a través de su capacidad de realizar fotosíntesis aportan el 95% del oxígeno atmosférico y el 90 % de la materia orgánica en los océanos (Avaria 1999). Las microalgas se distribuyen prácticamente en todos los sistemas acuáticos del mundo, encontrándose mayoritariamente en las primeras capas de la columna de agua debido a la alta incidencia de luz, siendo más abundantes en las zonas costeras que en las oceánicas (Guzmán & Suárez 1998). Las comunidades fitoplanctónicas son muy diversas y variadas siendo las clase más dominantes por su incidencia las Bacillariophyceae (diatomeas), Dinophyceae (dinoflagelados) y Prymnesiophyceae (cocolitofóridos), Cryptophyceae, Chlorophyceae, Raphidophyceae y Euglenophyceae, constituyendo la mayor parte del nanoplancton (2 - 20µm) y microplancton (20 - 200 µm). En ocasiones cuando los factores primarios o limitantes (luz y nutrientes) y secundarios o reguladores (salinidad, temperatura y pastoreo de zooplancton) son óptimos, ciertas especies producen floraciones algales las cuales pueden causar discoloraciones en el agua a concentraciones de  $10^6 \text{ cél} \times \text{l}^{-1}$  (Reguera 2003), situación que en la mayoría de los casos es beneficioso para la acuicultura y las pesquerías de recursos marinos.

De las 5.000 a 10.000 especies de microalgas (Sournia *et al* 1991; Shimizu 1993) solo 45 especies, incluyendo las cianobacterias, pueden producir floraciones algales del tipo nocivas (FANs) (en inglés “Harmful Algal Blooms” o su acrónimo HAB), debido a que el florecimiento conlleva la producción de toxinas (ficotoxinas), las cuales son acumuladas en moluscos, como por ejemplo bivalvos filtradores (García *et al* 2004, Valreitzis & Undelan 2008, Bauder *et al* 2001, Torgersen *et al* 2008) y que al ser consumidos por el ser humano generan efectos tóxicos (Lagos 1998, Danaras 2001).

Las ficotoxinas, pueden acumularse en varios tipos de animales marinos, como peces, cangrejos y todo tipo de bivalvos filtradores tales como Choritos, Cholgás, Almejas, Navajuelas y Ostiones. En bivalvos, dada la alta capacidad de filtración que poseen, pueden acumular las ficotoxinas en grandes cantidades en sus glándulas digestivas sin causarles efectos adversos a estos mismos. Sin embargo, cuando los mariscos contaminados con cantidades significativas de este tipo de ficotoxinas son consumidos por animales o personas, estos pueden generar intoxicaciones severas. A nivel mundial, intoxicaciones de éste tipo de ficotoxinas bordean los 60.000 casos por año, sumándose a ello el alto impacto de daño a nivel ecológico, medio ambiental y económico debido al efecto sobre áreas de desarrollo turístico, recreacional y la industria mitícola y acuícola (Gerssen *et al.* 2010). En Europa, las pérdidas anuales estimadas por el efecto de las FAN, en el área del turismo es de aproximadamente 700 millones de euros y aproximadamente 116 millones de

euros en la industria mitilícola (Morgan *et al.* 2009). Con el objetivo de evitar las intoxicaciones por el consumo de mariscos con ficotoxinas y mitigar sus efectos nocivos, entidades internacionales han desarrollado normas, legislaciones y programas de monitoreo (European Union 2011).

Hallegraeff (1995) ha clasificado las FAN según el problema que ocasionen, destacando 3 tipos:

1. Floraciones de especies no tóxicas, que pueden producir decoloraciones inocuas del agua, que en casos excepcionales pueden crecer a densidades tales que pueden provocar la disminución del oxígeno disuelto en el agua afectando a todos los organismos marinos.
2. Floraciones de especies no tóxicas para los humanos, pero que dañan a peces e invertebrados, en especial en sistemas intensivos acuícolas, y
3. Floraciones de especies que producen toxinas que por intermedio de cadena alimenticia pueden afectar al ser humano siendo los principales venenos de microalgas descritos hasta la fecha y que se agrupan en las siguientes categorías (Toyofuku 2006):
  - **Grupo Azaspirácidos (AZA):** Veneno azaspirácido (AZP)
  - **Grupo de Brevetoxinas:** Neurotoxinas producidas por el dinoflagelado *Karenia brevis* y que se denomina Veneno Neurotóxico de Moluscos (VNM) o NSP (de su sigla en inglés).
  - **Grupo de Iminas cíclicas:** incluye gymnodimina, spirolidas, pinnatoxinas, proroentraloides y spirocentrimina.

- **Grupo del ácido Domoico (AD):** Veneno Amnésico de Moluscos (VAM) o ASP (en inglés).
- **Grupo del Ácido Okadaico (AO):** Veneno Diarreico de Moluscos (VDM), incluye el AO y sus derivados las Dinofisistoxinas (DTXs).
- **Grupo de las Pectenotoxinas (PTXs):** Producidas por los dinoflagelados *Dinophysis fortii*, *D. acuta*, *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. novergica*. Incluyendo a la fecha las formas toxicas PTX-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 11.
- **Grupo de Saxitoxinas (STX):** Veneno Paralizante de Moluscos (VPM), producidas por dinoflagelados del género *Alexandrium sp* y *Gymnodinium*, que igualmente pueden ser producidas por cianobacterias de agua dulce.
- **Grupo de Yessotoxinas (YTX):** Producidas por la especie *Protoceratium reticulatum*.

De este grupo de toxinas descritas dos están presentes en nuestro país, VDM y VPM, las que se encuentran distribuidas entre la Región de los Lagos y la Región de Magallanes y la Antártica chilena. Adicionalmente se ha descrito la potencial existencia de VAM debido a la frecuente floración de *Pseudo-nitzschia australis* en aguas chilenas (Lagos 1998), Pectenotoxinas en *Dinophysis acuminata* (Blanco et & Uribe 2007) y recientemente se ha detectado Azaspirácidos a niveles bajo la norma en muestras de Ostiones y Choritos (López-Rivera et al. 2010).

## **Floraciones Algales Nocivas en Chile**

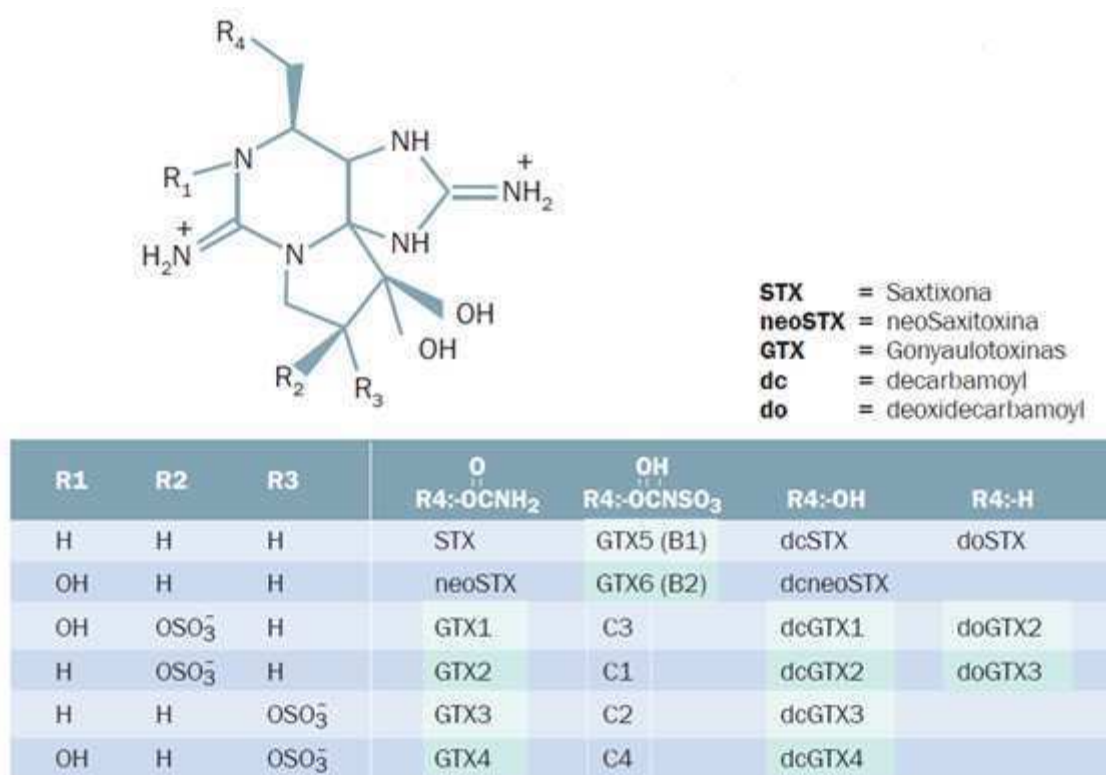
Las floraciones de algas nocivas (FAN) ocurren con una creciente frecuencia y en extensas áreas costeras del planeta, incluyendo Chile, produciendo cada año más de 2.000 casos de intoxicaciones en humanos con un 15% de mortalidad. Los impactos económicos negativos se generan por reducción de la extracción de recursos marinos, aumento de exclusión laboral, disminución del mercado interno y menor exportación de los recursos generados por pérdida de confianza en los productos alimenticios (Guzmán & Suárez 1998).

Uno de los problemas más importantes que afecta la comercialización de mitílidos tanto de ambiente natural como de cultivos, es la presencia de florecimientos nocivos de microalgas en las zonas de cultivo y bancos naturales. Por sus hábitos alimentarios las especies filtradoras son capaces de acumular las sustancias tóxicas generadas por algunas microalgas (Lagos 1998). Este efecto se evidenció de forma drástica el año 2002, cuando las toxinas del VPM afectaron la zona de Chiloé y aún más en los últimos años al ser detectados las toxinas diarreicas y los nuevos grupos lipofílicos como PTXs y YTXs (García *et al* 2004, 2005 y 2010).

## **Veneno Paralizante de Moluscos (VPM)**

El Veneno Paralizante de Moluscos (VPM), se encuentra formado por más de 26 isómeros toxinas de naturaleza no proteica, las que presentan un núcleo común denominado Tetrahidropurina (Figura 1). Químicamente, estas toxinas se dividen en tres grupos de acuerdo a la carga neta que presentan a pH neutro.

Estos grupos corresponden a: grupo de las saxitoxinas (STXs) con carga neta +2, grupo de las Gonyautoxinas (GTXs) con carga neta +1, y el grupo de sulfocarbamoilsaxitoxina (C1-C4) con carga neta 0 (Schantz *et al.* 1975, Oshima 1995b, Onodera *et al.* 1997).



**Figura 1.** Estructuras químicas de las toxinas del Veneno Paralizante de Moluscos (VPM).

En el mar, este tipo de toxinas son sintetizadas por dinoflagelados de los géneros, *Alexandrium spp*, *Pirodinium sp*, y *Gymnodinium spp* (Hall *et al.* 1990, Hallegraeef 1993, Yasumoto & Murata 1993, Oshima 1995b), y en agua dulce, por

cinco especies de cianobacterias: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*, *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Planktothrix* sp. (Falconer 1996, Onodera *et al.* 1997, Lagos *et al.* 1999, Pereira *et al.* 2000, Oshima 1999). Estas toxinas son acumuladas por moluscos bivalvos filtradores tales como la Cholga (*Aulacomya ater*), Choritos (*Mytilus edulis chilensis*), Culengue (*Gari solida*); y por moluscos gasterópodos carnívoros como el Loco (*Concholepas concholepas*) y el Caracol del sur (*Argobuccinum ranelliformes*). En el caso de los organismos filtradores los cuales son capaces de concentrar estas toxinas, se les denomina transvectores y al ser consumidos por el hombre producen la enfermedad paralítica aguda la cual presenta un cuadro clínico de muy variable intensidad y duración (Long *et al.* 1990, López *et al.* 1992, Gerssner *et al.* 1997). Los síntomas más frecuentes de menor a mayor intensidad son:

- Parestesias peribucal, facial y de manos.
- Debilidad muscular cervical.
- Disfagia y disfonía.
- Dificultad para deambular.
- Náuseas, vómitos, broncoaspiración.
- Parálisis respiratoria.
- Compromiso del sistema nervioso autónomo.

Por otra parte, existe la posibilidad de biotransformaciones de las toxinas a lo largo de su transmisión a través de la cadena trófica, mediante diferentes procesos metabólicos, de tal forma que la composición toxica de los transvectores, y por lo tanto de los mariscos, puede diferir de las microalgas productoras de las toxinas (Oshima 1995a).

El mecanismo de acción de las toxinas del VPM está bien descrito a nivel molecular. Su receptor farmacológico es la proteína intrínseca de membrana conocida como el Canal de Sodio dependiente de Voltaje. Las toxinas del VPM actúan uniéndose reversiblemente, con altísima afinidad (en concentraciones de  $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ) a su sitio de unión en el canal de sodio, bloqueando el paso de iones sodio hacia el interior de la célula (Schantz *et al.* 1975).

Las toxinas del VPM, debido a sus características estructurales (sustituciones en sus radicales) presentan también diferentes afinidades por su receptor, por esto, cada una de estas toxinas presenta una toxicidad específica característica expresada en Unidades Ratón (MU, mouse units) por  $\mu\text{mol}$  de toxina (MU/  $\mu\text{mol}$ ). Esta toxicidad específica, determinada para cada toxina pura, permite transformar las unidades de masa (cantidad neta de toxina medida por HPLC) en una toxicidad equivalente en MU, de tal manera que se puede calcular la toxicidad de una muestra de molusco y expresarla en unidades equivalentes (Oshima 1995b).

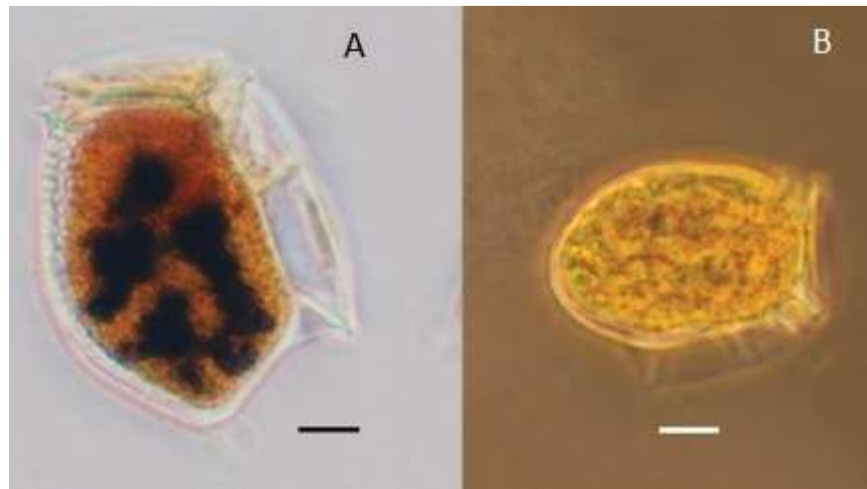
A su vez, la regulación de la comunidad europea aceptada por la Organización Mundial de Comercio, para el comercio y consumo de molusco establece que: “El

nivel de VPM en las partes comestible de los mariscos no debe exceder los 80 µg / 100 g de carne determinado por el bioensayo ratón que puede estar asociado con un método químico reconocido” (European Union 2011).

### **Veneno Diarreico de Moluscos (VDM)**

El Veneno Diarreico de Moluscos está constituido por el ácido okadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTXs), toxinas lipofílicas, que corresponde a un grupo de macrólidos poliéteres *trans*-fusionados de ácidos grasos de cadena larga.

El VDM es conocido por producir un cuadro clínico gastrointestinal severo que se provoca por el consumo de mariscos contaminados con toxinas producidas por dinoflagelados planctónicos del género *Dinophysis sp* (figura 2) y bentónicos como *Prorocentrum sp* (Suzuki *et al.* 1999). El primer caso de intoxicación por consumo de moluscos se produce en Holanda en 1960 (Kat 1979). Sin embargo, la primera intoxicación asociada a VDM ocurre en Japón en el año 1976, donde 42 personas resultaron intoxicadas por el consumo de moluscos (Yasumoto *et al.* 1978).

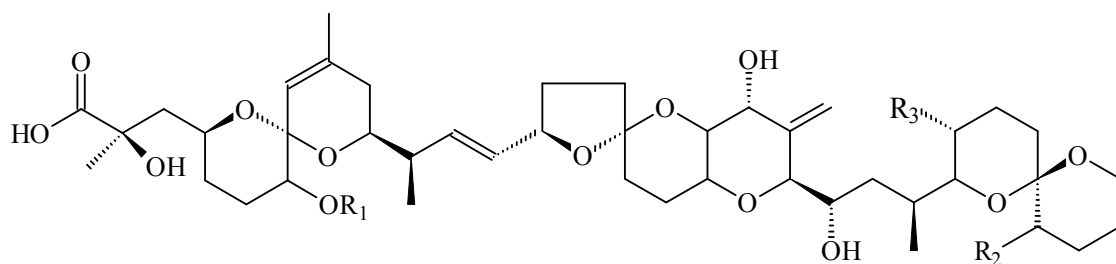


**Figura 2.** Microscopía óptica de: A. *Dinophysis acuta* y B. *Dinophysis acuminata*. La barra corresponde a 10 micrones (tomado de Lembeye 2006)

La distribución de VDM es mundial, detectándose en países tales como Japón, Noruega, Dinamarca, Alemania, Irlanda, Inglaterra, Tailandia, India, Australia, Nueva Zelanda, Brasil, México, Canadá, costa oeste de los Estados Unidos y Chile (Gessner *et al.* 2010), país en donde la primera intoxicación por VDM se produjo en 1970 en el estuario de Reloncaví, Región de los Lagos (Muñoz *et al.* 1992).

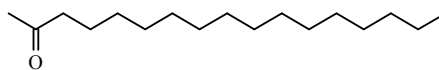
Las toxinas diarreicas, compuestos poliéteres liposolubles y termoestables son acumulados en los tejidos de los bivalvos como Chorito (*Mytilus edulis chilensis*), Cholga (*Aulacomya ater*), Almeja (*Venus antiqua*), Navajuela (*Tagelus dombeii*), Macha (*Mesodesma donacium*), y gasterópodos como Locos (*Concholepas concholepas*) y Caracol locote (*Thais chocolate*) (González 2003). A la fecha se han identificado 3 tipos de toxinas productoras del VDM, ácido okadaico (AO),

Dinofisistoxina-1 (DTX-1) y Dinofisistoxina-2 (DTX-2) (Fig. 3). Este tipo de toxinas son potentes inhibidores de las serina/treonina proteína fosfatasa 1 (PP-1) y 2 A (PP-2 A), enzimas que están involucradas en la mayoría de las vías metabólicas, demostrándose además ser potentes promotores de tumores (Suganuma *et al.* 1988, Fujiki *et al.* 1988).



Acido Okadaico (AO)	R1 = H,	R2 = H	R3 = CH <sub>3</sub>
Dinophysistoxina-1 (DTX-1)	R1 = H,	R2 = CH <sub>3</sub>	R3 = CH <sub>3</sub>
Dinophysistoxina-2 (DTX-2)	R1 = H,	R2 = CH <sub>3</sub>	R3 = H
Dinophysistoxina-3 (DTX-3)	R1 = Acyl	R2 = CH <sub>3</sub>	R3 = CH <sub>3</sub>

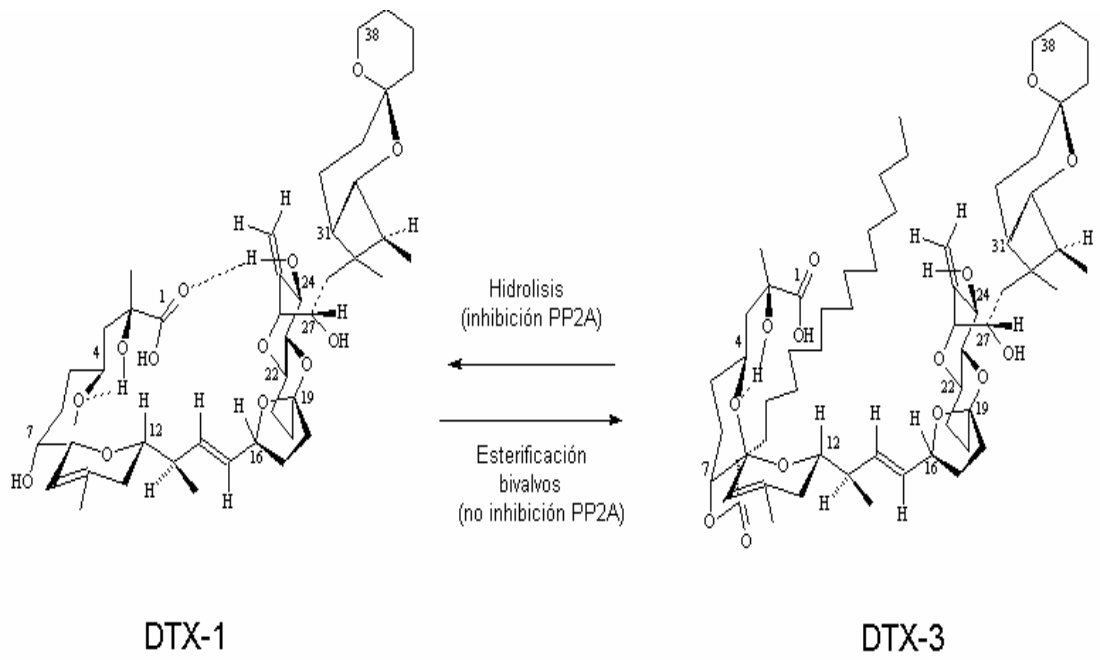
Grupo Acyl Típico



**Figura 3.** Estructura química del AO y sus derivados.

## 7-O-acyl derivados de DTX-1

En los bivalvos, las toxinas del VDM sufren modificaciones químicas por acción directa de enzimas que contienen los bivalvos. De esta forma, Dinofisistoxina-1 (DTX-1) es esterificada en el grupo hidroxilo del carbono 7 mediante una reacción enzimática, generando la adición de ácidos grasos de longitudes variables, que pueden ir desde ácido tetraicoico (C14:0) al ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$  3) (Torgensen *et al*, 2008). Cuando en la esterificación de DTX-1, se involucra el ácido palmítico, adquiere el nombre de 7-O-acyl-palmitoyl-DTX-1, adquiriendo el nombre más comúnmente conocido de Dinofisistoxina-3 (DTX-3) (Suzuki *et al.* 1999) (Fig. 4). Esta nueva variedad tóxica no produce actividad inhibitoria sobre la Proteína Fosfatasa PP-2. Sin embargo, DTX-3 al ser hidrolizada por enzimas digestivas tales como lipasas y algunas esterasas, renueva su forma química original, esto es DTX-1, generando el cuadro tóxico característico de una intoxicación con VDM (Suzuki *et al.* 1999, García *et al.* 2005, García *et al.* 2006).



**Figura 4.** Estructura química y plegamiento de DTX-1 y DTX-3

## **Toxinas lipofílicas asociadas al Veneno Diarreico de Moluscos (VDM)**

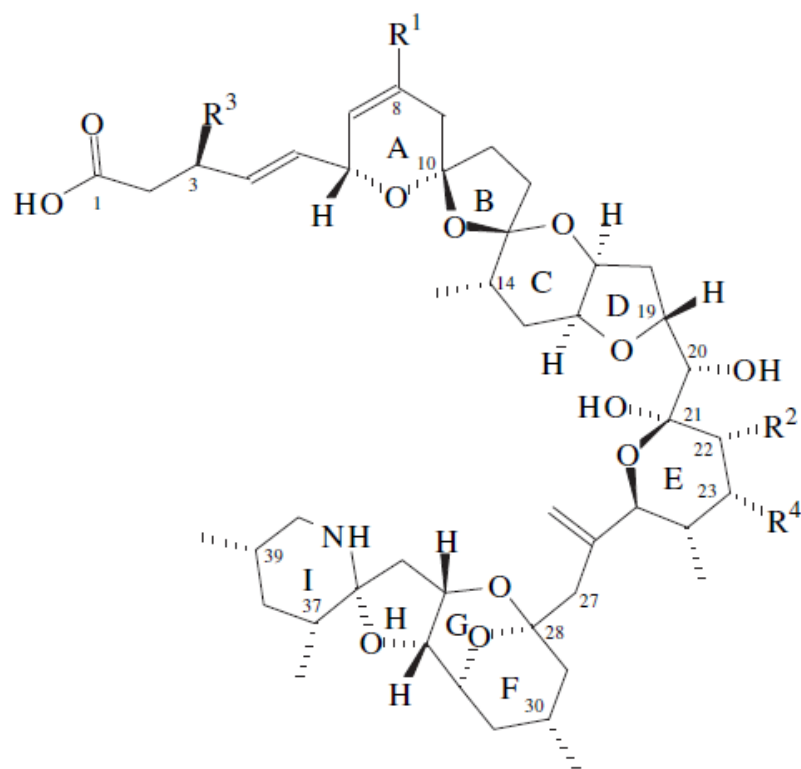
La toxicidad es un factor en común que poseen las ficotoxinas, lo que permite agruparlas según propiedades fisicoquímicas y por el tipo de efecto que produce en el ser humano. Las toxinas lipofílicas poseen propiedades de solubilidad comunes, por lo que es posible extraerlas juntas, haciendo que el bioensayo que es uno de los métodos de certificación más extendidos a nivel mundial, sea de poca especificidad y sensibilidad. Las toxinas lipofílicas que generalmente se asocian con el VDM corresponde a los Azaspirácidos (AZA), Pectenotoxinas (PTX) y las Yessotoxinas (YTX), las cuales poseen mecanismos de acción específicos y diferentes del AO y DTXs (Gerssen *et al.* 2010).

### **Azaspirácidos (AZA)**

Los azaspirácidos son toxinas descubiertas recientemente asociadas con la intoxicación por mariscos contaminados con VDM. Se detectaron por primera vez en Noviembre de 1995 por la ingestión de moluscos (*Mytilus edulis*) provenientes de un cultivo de Puerto Killary, Irlanda, donde provocó la intoxicación de personas con síntomas similares a los causados por VDM (nauseas, vómitos, diarrea severa y dolor estomacal). Sin embargo, la cantidad de AO y DTX-2 detectadas en las muestras, estaban muy por debajo de su capacidad tóxica (McMahon & Silke 1996). De ésta intoxicación y luego de análisis de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y Espectrometría de Masa (MS) se detectó una estructura con

características de anillo de unión azaspiro, una amina cíclica y un ácido carboxílico, por lo cual se denominó Azaspirácidos (AZA) (figura 5).

Aunque el AZA-1 es la toxina predominante en las muestras de moluscos, se han identificado otros Azaspirácidos que son análogos estructurales de éste, el 8-metil-azaspirácido (AZA-2), 22-demetilazaspirácido (AZA-3), 3-hidroxi-22-demetilazaspirácido (AZA-4), 22-demetilazaspirácido (AZA-5) y los análogos hidroxilo (AZA-6 hasta AZA-11) (Furey *et al.* 2010). La producción de las toxinas de los azaspirácidos se le atribuyó en un principio al dinoflagelado *Protoperidinium crassipes*, pero un estudio posterior estableció que *Azadinium spinosum* es productor de las toxinas (AZA-1, AZA-2 y un análogo de AZA-2) demostrando que *P. crassipes* (al ser una microalga depredadora) es un vector de las toxinas (Tillman *et al.* 2009). La identificación de AZAs en mariscos ha sido descrita en Irlanda, UK, Noruega, Francia, Portugal, Norte de África (Marruecos), Chile y U.S.A. (Torgersen *et al.* 2008, Amzil *et al.* 2008, Vale *et al.* 2008, López-Rivera *et al.* 2010). Sin embargo, cada año nuevas formas de AZAs se han detectado como resultado de los programas de monitores en diferentes países de la Comunidad Europea, lo que se traduce en perfiles tóxicos variables, dependiendo de la especie que las acumule y el grado de biotransformación que se detecte (hepatopáncreas). Estas últimas isoformas de AZAs, sólo se han podido determinar con la utilización de LC-MS/MS, análisis que se ha implementado como técnica alternativa en los controles sanitarios de mariscos (James *et al.* 2008).



**Figura 5.** Estructura química de las 6 toxinas predominantes de Azaspirácidos. AZA-1 ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$ ), AZA-2 ( $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$ ), AZA-3 ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$ ), AZA-4 ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = OH$ ,  $R_4 = H$ ), AZA-5 ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = OH$ ), AZA-6 ( $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$ )

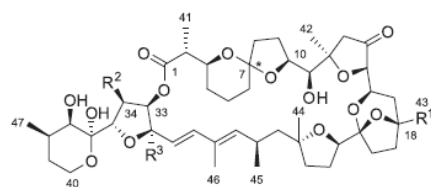
Los mecanismos de acción de este tipo de toxinas no se han determinado con claridad, aún cuando estudios preliminares *in vitro*, desde células de mamíferos, muestran alteraciones en la estructura del cito esqueleto y sobre el sistema E-cadherin, responsable en la interacción entre células (Twiner *et al.* 2005, Ronzitti *et al.* 2007). Estos resultados experimentales podrían explicar de alguna forma los

síntomas asociadas a las intoxicaciones descritas; desorden gastrointestinal, dolor abdominal y diarrea (James *et al.* 2002), ya que los resultados obtenidos desde bioensayos en ratón con extractos de mariscos a bajas concentraciones de AZA muestran que estos no ocasionan diarrea a los ratones (Ito & Satake, 2002). Sin embargo, transcurridos unas pocas horas, los ratones presentan parálisis y problemas respiratorios, produciéndose su muerte a 1,5 horas post-inyección del extracto (Satake *et al.* 1998). Estudios posteriores, han determinado que la dosis *i.p.* letal en ratones es dependiente de la forma tóxica presente en los extractos de mariscos, ya que la toxina AZA-1 presenta una dosis letal de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que los isómeros AZA-2 y AZA-3 poseen toxicidades letales más elevadas de 110  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 140  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente (Ofuji *et al.* 1999). Siendo la biotransformación de este tipo de toxinas en mariscos un factor no menor, considerando las variables tóxicas que pudiese presentar un marisco. De esta forma, variedades tóxicas detectadas en mariscos y que en una primera etapa presentaban sólo AZA-2 y AZA-3, fueron biotransformadas a nuevas formas tóxicas, tales como AZA-4 y AZA-5, variantes que por poseer una menor toxicidad no dejan de ser preocupantes desde el punto de vista sanitario (Twiner *et al.* 2008). Por su parte la toxicidad oral en ratones con AZA-1, en altas dosis (900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ocasionan en pocas horas daños relevantes en el intestino delgado, mientras que niveles de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , evidencian sólo daño hepático, lo que se traduce en el aumento del volumen del órgano en cuestión (38% de aumento post-inyección) (Ito *et al.* 2000).

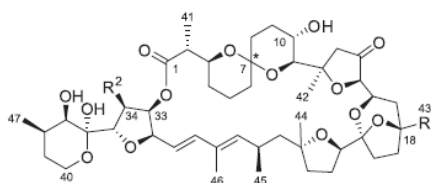
## **Pectenotoxinas (PTX)**

Las Pectenotoxinas son una familia de toxinas macrólidas poliéter que se detectaron por primera vez en la glándula digestiva del ostión *Patinopecten yessoensis* cultivado en Japón (Yasumoto *et al.* 1985). El dinoflagelado identificado en un principio como productor de estas toxinas fue *Dinophysis fortii* y actualmente también se han encontrado en *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. rotundata*, *D. norvegica* y en los dinoflagelados heterotróficos *Protoperidinium divergens*, *P. depressum* y *P. crassipes* (Blanco *et al.* 2007, Domínguez *et al.* 2010). A la fecha, se han detectado e identificado diversos análogos de PTXs en cultivos de microalgas, muestras de floraciones naturales y muestras de mariscos (figura 6), siendo comúnmente encontradas en microalgas PTX-2, PTX-11, PTX-12 y PTX-13 (Dominguez *et al.* 2010). Nuevas formas isoméricas de PTX-2 tales como PTX-4, PTX-6 y PTX-7 han sido detectadas en nuevos florecimientos naturales, variedades que al ser filtrados y acumuladas por los mariscos generan nuevas formas isoméricas tóxicas, proceso ocasionado por la metabolización ocurrida en los mariscos. Para diferenciar la nomenclatura desde las formas tóxicas provenientes desde los dinoflagelados y de las obtenidas desde los mariscos es que se les ha asignado a estas últimas variedades el término PTX-seco ácido (PTX-SA) (Dominguez *et al.* 2010). Las isoformas tóxicas tales como Pectenotoxina-2 (PTX-2), Pectenotoxina-2 seco ácido (PTX2sa) y 7-epi-Pectenotoxina-2 seco ácido (7-epi PTX2sa) son las formas tóxicas predominantes que se han descrito en programas de monitoreo e investigaciones realizadas en

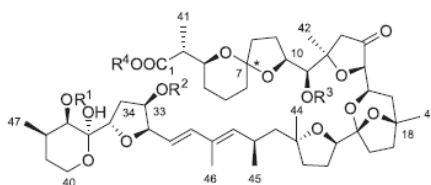
Europa (Vale & Sampayo 2002). A la fecha, 15 formas de análogos tóxicos de PTX han sido descritas (Miles *et al.* 2006), siendo los últimos isómeros en detectarse formas esterificadas de PTX-2A-SA, denominándoseles como 37-O-acyl-esters-PTX-2-SA, 11-O-acyl-esters-PTX-2-SA y 33-O-acyl-esters-PTX-2-SA, las cuales han sido detectadas sólo en mariscos y no en los dinoflagelados productores de PTXs (Aasen *et al.* 2006)



NOMBRE	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	C-7
PTX-1	CH <sub>2</sub> OH	H	H	R
PTX-2	CH <sub>3</sub>	H	H	R
PTX-2b	CH <sub>3</sub>	H	H	S
PTX-3	CHO	H	H	R
PTX-4	CH <sub>2</sub> OH	H	H	S
PTX-6	COOH	H	H	R
PTX-7	COOH	H	H	S
PTX-11	CH <sub>3</sub>	OH	H	R
PTX-11b	CH <sub>3</sub>	OH	H	S
PTX-13	CH <sub>3</sub>	H	OH	R



NOMBRE	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	C-7
PTX-2c	CH <sub>3</sub>	H	S
PTX-8	CH <sub>2</sub> OH	H	S
PTX-9	COOH	H	S
PTX-11c	CH <sub>3</sub>	OH	S



NOMBRE	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
PTX2 seco acid (PTX-2-SA)	H	H	H	H
PTX-2-SA ME	H	H	H	CH <sub>3</sub>
37-O-Acyl PTX-2 seco acid	Acyl	H	H	H
33-O-Acyl PTX-2 seco acid	H	Acyl	H	H
11-O-Acyl PTX-2 seco acid	H	H	Acyl	H

**Figura 6.** Estructura química de Pectenotoxinas (PTXs) y análogos.

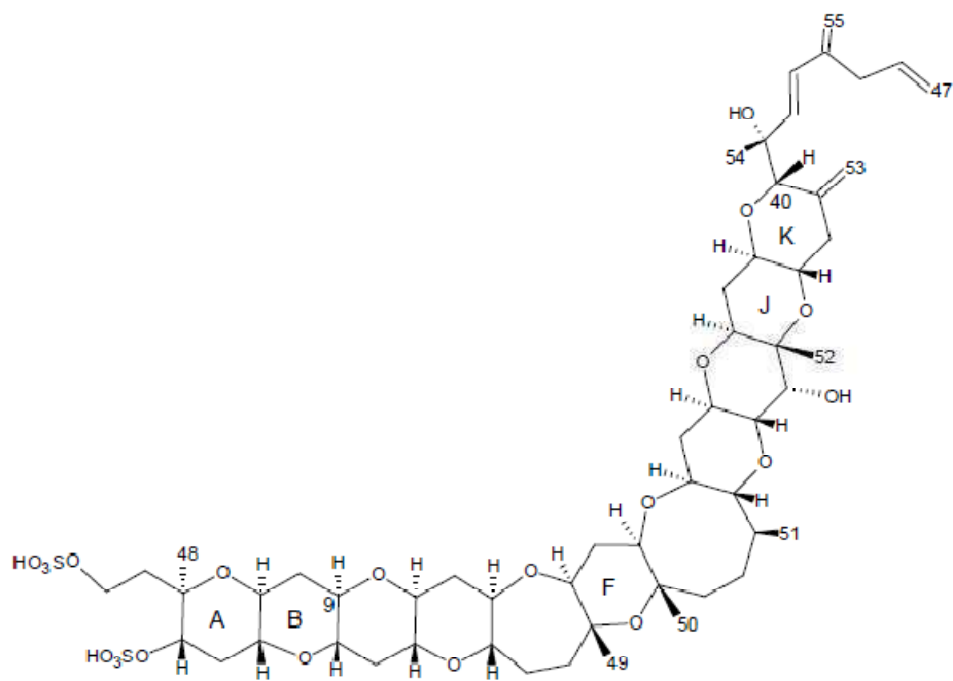
PTXs han sido incluidas dentro del grupo del VDM por haber sido detectadas en conjunto con AO en moluscos, pero no producen diarrea en los bioensayos y

tampoco producen inhibición de las PP1 y PP2A (Gessner *et al.* 2010). La información disponible sobre la toxicología de PTXs no ha sido bien desarrollada y son pocos los resultados biológicos disponibles. De esta forma, la escasa información contenida de este grupo tiene relación con experimentos dirigidos *in vitro* e *in vivo*, de modo que los resultados obtenidos puedan definir los posibles riesgos que puedan causar las PTXs sobre la salud humana al verse expuesta por este tipo de toxinas al consumir mariscos contaminados. La toxicidad de las PTXs, después de la administración intraperitoneal (*i.p.*) u oral en ratones se consideran resultados comparables. Así por ejemplo, los daños observados después de la administración *i.p.* de PTX-2 en ratones, evidencia un alto daño a nivel hepático por la generación de vacuolas y la deformación de los hepatocitos. Datos que se potencian a los hallazgos histológicos obtenidos por administración de PTX-2 por vía oral. Estos datos demuestran el daño hepático y digestivo producido por la toxina. Sin embargo, nunca se evidencio la presencia de diarrea en los experimentos (Miles *et al.* 2004). Adicionalmente, PTX-2 ha sido encontrado por ser potencialmente citotóxico en líneas celular cancerígenas de pulmón, colón y riñón, efecto no extrapolable a sus formas toxicas tales como PTX-2-SA y 7-epi-PTX2-SA, determinándose por lo tanto, la importancia de la estructura inicial de las toxinas que generen las acciones citotóxicas (Jung *et al.* 1995).

En Chile se ha detectado la presencia de PTXs en floraciones de *Dinophysis acuminata* en Bahía Inglesa, siendo la toxina detectada correspondiente a PTX-2 en una concentración de 180 pgcel<sup>-1</sup> (Blanco *et al.* 2007).

## Yessotoxinas (YTX)

Las Yessotoxinas son toxinas detectadas por primera vez en Mutsu Bay, Japón en 1986 (Murata *et al.* 1987) en glándulas digestivas del Ostion *Patinopecten yessoensis*, razón por la cual adquirió el nombre. La detección de YTX en moluscos ha sido recurrente en diferentes partes del mundo, tales como Portugal, Noruega, Italia, Nueva Zelanda, Chile, España y Rusia (Paz *et al.* 2008, Vale *et al.* 2008), identificándose a las microalgas *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera* como responsable de su origen (Dominguez *et al.* 2010). Las Yessotoxinas son poliéter disulfatados, de elevado peso molecular  $[M-H]^-$  1141 m/z, que poseen un esqueleto de 47 carbonos en forma de de escalera, con 11 anillos éter contiguos, una cadena lateral terminal insaturada de 9 carbonos y 2 ésteres de sulfato (fig 7). Al igual que las otras toxinas, las YTX poseen numerosos análogos descritos cuyos pesos moleculares oscilan entre 955 y 1551 g/mol (Miles *et al.* 2006).



**Figura 7.** Estructura química de Yessotoxina (YTX).

Existen cerca de 100 análogos de YTX que se han detectado mediante ensayo ELISA provenientes de muestras de bivalvos y dinoflagelados, pero solo cerca de 40 de ellos han sido identificados. La mayoría de las YTX provienen del dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* y el primer análogo encontrado fue 45, 46, 47-trinor-YTX (norYTX), luego homo-YTX, noroxo-YTX, 40-epi-41-ceto-YTX, 41-ceto-YTXenona, 41a-homoYTX, 9-Metil-41-ceto-YTXenona, 44,55-dihidroxi-YTX, 44,55-dihidroxi-41a-homoYTX, 44,55-dihidroxi-9-metil-41a-YTX, 45 hidroxidinor-YTX, 44-oxotrinor-YTX, 41a-homo-44-oxotrinor-YTX, 45,46,47-trinorhomo-YTX, furano-YTX, además de los derivados glicosilados proroceratina-II, III y IV (Dominguez *et al.* 2010). En moluscos, también se han encontrado análogos de

YTX, los que son: 45-hidroxi-YTX, 45, 46, 47-trinor-YTX, homoYTX, 45-hidroxi-homo-YTX, adriatoxina, carboxi-YTX, carboxi-homo-YTX, noroxo-homo-YTX, noroxo-YTX, 1-desulfo-YTX, 41a-homoYTX, 44,55-dihidroxi-YTX, 45-hidroxicarboxy-YTX, 1-desulfocarboxi-homo-YTX y 4-desulfocarboxi-homo-YTX (Dominguez *et al.* 2010).

Históricamente las YTXs han sido clasificadas dentro del grupo VDM, sin embargo, este tipo de toxinas no produce diarrea en bioensayos de ratones, ni tampoco produce la inhibición de proteínas fosfatasas (Ogino *et al.* 1997, Tubaro *et al.* 2003), razón por la cual ha sido clasificada como grupo aparte. La administración oral de YTX en ratones en condiciones aguda no es letal (10 mg/Kg), ni tampoco se observa diarrea ni daños digestivos considerables, donde sólo una evaluación histopatológica a determinado daño en las células del miocardio (Aune *et al.* 2002).

A la fecha, no existe la evidencia científica que asocie intoxicaciones de personas por el consumo de mariscos contaminados con YTX (Miles *et al.* 2006). El mecanismo de acción del la YTX no ha sido dilucidado del todo, sin embargo, estudios muestran que YTX altera la permeabilidad de  $Ca^{2+}$  en las células induciendo apoptosis y la activación de la fosfodiesterasa (PDEs) que disminuye los niveles intracelulares de AMPc, lo que explicaría en cierta forma la cardiotoxicidad en ratones (Dominguez *et al.* 2010).

## Métodos de detección de las toxinas diarreicas, lipofílicas y paralizantes

Para la determinación de las toxinas marinas se emplean diferentes métodos de detecciones los que pueden ser de tipo biológicos (*in vivo* e *in vitro*), bioquímicos y/o fisicoquímicos. En Chile, los métodos usados para la detección de las toxinas corresponden al bioensayo en ratón (VPM y VDM) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el Veneno Amnésico de Moluscos (tabla 1).

**Tabla 1.** Niveles máximos y métodos de detección de las toxinas marinas. (Programa Nacional Integrado de Marea Roja o Floraciones algales Nocivas 2010).

<b>Biotoxina</b>	<b>Nivel máximo</b>	<b>Método oficial</b>
<b>VPM</b>	80 microgramos de saxitoxina equivalente por 100 gramos de producto	Bioensayo en ratón estándar de la A.O.A.C. 2007
<b>VDM</b>	Bioensayo negativo	Bioensayo en ratón estándar UE 2007
<b>VAM</b>	20 microgramos de ácido domoico por gramo de producto	HPLC estándar J.A.O.A.C Vol. 78 n°2 1995 Quillam.

La aplicación del bioensayo de ratón como método de referencia para la detección de toxinas marinas ha sido criticada en la Unión Europea, debido a la gran variabilidad de resultados entre laboratorios y por su poca sensibilidad (entre otros) por lo que la tendencia es cambiar a métodos analíticos (HPLC, LC-MS y LC-MS/MS) para la detección de ficotoxinas marinas (European Union 2011).

### **Bioensayo de ratón**

El bioensayo de ratón es uno de los métodos más usados para la detección de toxinas del VDM y VPM. Para la detección de las toxinas del VPM se inyecta 1ml de extracto ácido de marisco a ratones de 20 gramos de peso, registrándose el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la muerte del animal. La toxicidad de la muestra evaluada se expresa en unidades de ratón (UR) y se calcula según las curvas de respuesta a las dosis obtenidas con estándares de STX. Por otro lado, para determinar toxinas diarreicas se extraen las toxinas del tejido de los mariscos con acetona, se evaporan los extractos, se disuelven los residuos en 1 ml de 1% de Tween-60 y el cual se inyecta intraperitonealmente a 3 ratones de entre 16 y 20 g de peso. La muestra es positiva si 2 ratones o más mueren producto de la inyección, pero su gran desventaja es poseer un límite de detección de 800 µg/kg de toxina de VDM en moluscos, lo que lo hace un método muy poco sensible y además de no poder diferenciar los tipos de toxinas presentes en un extracto para evaluación de toxinas lipofílicas.

## **Cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente en línea (HPLC-FLD)**

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica analítica que de acuerdo al método y técnica utilizadas permite separar, identificar y cuantificar las toxinas del VDM, VPM y VAM. El método de análisis del HPLC se basa en los tiempos de retención (detección) que son específicos para cada analito y la comparación entre material de referencia (estándar) para la cuantificación. Las ventajas sobre el bioensayo y métodos bioquímicos es que la reacción va dirigida sobre las estructuras químicas de las toxinas, posee una mayor especificidad, precisión y es reproducible entre los laboratorios. Las desventajas que posee el método son la necesidad de estándares analíticos certificados.

## **Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS)**

En la actualidad es la herramienta analítica más poderosa para identificar y determinar múltiples toxinas. Es un método de alta sensibilidad, especificidad, selectividad y válida para aportar información estructural muy importante en la confirmación de toxinas y en la identificación de nuevas toxinas y sus análogos. A diferencia del método por HPLC-FLD, no requiere de tantos pasos de purificación y derivatización, siendo posible la detección de varias toxinas en una sola corrida cromatográfica.

Para la determinación de este gran número de toxinas marinas mencionadas y sus isómeros relacionados, se ha propuesto varios métodos biológicos (*in vivo* y *in vitro*), bioquímicos y químicos. Sin embargo, las técnicas analíticas químicas son las únicas que permiten determinar el grado de complejidad del perfil de toxinas de las clases lipofílicas presentes en dinoflagelados productores y las isoformas biotransformadas que se detectan en mariscos. En los últimos años, el conocimiento en el tema de toxinas lipofílicas ha crecido de forma importante, traducándose esto en el surgimiento de una gran cantidad de publicaciones relacionados con el tema. De esta forma, la comisión de la Comunidad Europea ha establecido guías normativas que definen los límites máximos de toxinas lipofílicas presente en los mariscos. De esta forma, los niveles máximos establecidos para la presencia de OA, DTXs y PTXs en combinación o por separado que se encuentren en las partes comestibles (cuerpo entero o alguna parte comestible por separado) de moluscos, equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos no podrán exceder los 160  $\mu\text{g}$  OA equivalentes/kg de mariscos. Mientras que los límite máximos establecidos para la presencia de YTX y AZA presentes en moluscos, equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos no podrán exceder de 1 mg YTX equivalentes/kg de mariscos para YTXs y 160  $\mu\text{g}$  AZA equivalentes/kg de mariscos para AZAs (European Union 2011).

Por lo anterior se devela la importancia del estudio del fenómeno de VDM y VPM en Chile, su nivel de presencia en la acumulación y biotransformación en los bivalvos y su relación de toxicidad en la cadena trófica, lo que lo establece como un tema relevante como estudios en Ciencias, permitiendo el aporte de conocimientos que pueden ayudar a la toma de decisiones decisivas y pragmáticas en cada evento que ocurre de este fenómeno.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar los perfiles tóxicos de toxinas lipofílicas (AO, DTX-1, AZA, PTX e YTX) y toxinas paralizantes VPM (STX, neoSTX, GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4 y GTX-5) en invertebrados marinos.

### **Objetivos específicos**

1. Definir el perfil tóxico de moluscos expuestos a FAN naturales productores de toxinas paralizantes y toxinas diarreicas de moluscos.
2. Determinar la concentración de toxinas paralizantes y toxinas diarreicas en las muestras de invertebrados marinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de Muestras

Las muestras de mariscos fueron recolectadas en el sector de Islas Huichas de la Región de Aysén (figura 8) como parte de los objetivos del proyecto de investigación FONDECYT N° 1090058, de acuerdo a autorización exenta N°130 del 5 de Febrero del 2010 de la Secretaría Regional Ministerial de Salud, Región de Aysén del Gral. Carlos Ibáñez del Campo.

En el sector mencionado, se fijaron 35 estaciones de muestreo (tabla 2) de las que se extrajeron mariscos según la disponibilidad y cantidad éstos, mediante buceo autónomo. Los recursos colectados correspondieron a bivalvos como Almeja (*Venus antiqua*), Cholga (*Aulacomya ater*), Culengue (*Gari solida*), Chorito (*Mytilus edulis chilensis*), Choro zapato (*Choromytilus chorus*) y Navajuela (*Tagelus dombeii*) y Gasterópodos como el Loco (*Concholepas concholepas*), Caracol del sur (*Argobuccinum ranelliformes*), y Picoroco (*Austromegabalanus psittacus*). A todos se les extrajo el hepatopáncreas y se almacenaron en metanol 90% en una razón de 1:1, para su posterior análisis en el laboratorio.

Todo el material utilizado durante la fase de experimentación se dispuso de acuerdo a las pautas de eliminación de desechos químicos y biológicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.



**Tabla 2.** Zonas, lugares y ubicación (GPS) de las 35 estaciones de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén.

Zona	Fecha muestra	LATITUD	LONGITUD	LUGAR
1	19-02-10	45.198162s	73.537395w	Isla Vergara
2	19-02-10	45.205010s	73.581064w	Isla Viel
3	19-02-10	45.201836s	73.592.660w	Isla Viel
4	19-02-10	45.192896s	73.586825w	Isla Viel
5	19-02-10	45.227354s	73.617837w	Islote La Garza
6	19-02-10	45.223340s	73.620868w	Islote La Garza
7	20-02-10	45.175410s	73.477686w	Islas Herraduras
8	20-02-10	45.181588s	73.476987w	Islas Herraduras
9	20-02-10	45.186551s	73.472231w	Islas Herraduras
10	20-02-10	45.184425s	73.464562w	Islas Herraduras
11	20-02-10	45.181452s	73.460608w	Islas Herraduras
12	20-02-10	45.174903s	73.446989w	Islas Herraduras
13	20-02-10	45.194944s	73.396193w	Punta Riel
14	20-02-10	45.190166s	73.358193w	Punta Riel
15	20-02-10	45.195302s	73.343199w	Punta Riel
16	21-02-10	45.124865s	73.497396w	Islote Los Amigos
17	21-02-10	45.114503s	73.502580w	Isla Julian
18	21-02-10	45.109127s	73.513445w	Isla Julian
19	21-02-10	45.103844s	73.510936w	Isla Julian
20	21-02-10	45.043770s	73.467782w	Punta Olea
21	21-02-10	45.038287s	73.437435w	Isla Ñancul
22	21-02-10	45.044544s	73.422865w	Isla Luchín
23	21-02-10	45.075572s	73.432999w	Isla Luchín
24	21-02-10	45.079594s	73.446156w	Isla Hilda
25	22-02-10	45.242198s	73.547886w	Isla Chaculay
26	22-02-10	45.242198s	73.547886w	Isla Chaculay
27	22-02-10	45.249272s	73.604551w	Isla Merinea
28	22-02-10	45.241406s	73.581214w	Isla Atenais
29	22-02-10	45.237966s	73.577138w	Isla Atenais
30	22-02-10	45.241370s	73.567984w	Isla Costa
31	22-02-10	45.228222s	73.533564w	Isla Pilcomayo
32	22-02-10	45.234422s	73.525405w	Isla Pilcomayo
33	22-02-10	45.233380s	73.497803w	Puerto Rosita
34	22-02-10	45.199729s	73.513791w	Punta Quintana
35	22-02-10	45.178624s	73.521049w	Isla Vergara

### **Preparación muestras para aislación de toxinas lipofílicas**

Se homogenizarón 20 g de cada tejido de muestras con 3 ml de metanol al 90% v/v, durante 5 minutos, para luego ser centrifugados a 2700 R.P.M. por 5 minutos, separándose el sobrenadante y obteniéndose un volumen de 10 ml aproximados. Esta etapa se repitió dos veces.

Los sobrenadantes obtenidos se juntaron, y de éstos se alicuotó 2.5 ml, los cuales fueron diluidos a 1/3 de su concentración con agua destilada y desionizada. El volumen final, 5 ml se aplicó a una columna de exclusión semipreparativa (Sep-Pak C18) con el objetivo de eliminar las impurezas, pigmentos y ácidos grasos. Luego comenzó una elución a polaridad ascendente de metanol. La fracción final resultante (metanol 100%) se almacenó a 4°C hasta su posterior análisis por cromatografía líquida con espectrofotometría de masa (LC-MS/MS) (García *et al.* 2010)

### **Preparación de Solución mix de Estándares**

Los estándares de toxina lipofílicas AO y DTX-1 (CRM-DSP-Mus-b), YTX (NCR-CRM-YTX), Pectenotoxinas (PTX)(NCR-CRM-PTX-2) y Azaspirácidos (AZA-1)(NCR-CRM-AZA-1) fueron adquiridos al "National Research Council Canada, NCR-Halifax, Canadá.

La solución mix de estándares se preparó mezclando 20 µL de PTX-2 a una concentración de 1.66 mM, 20 µL de YTX a una concentración de 1.53 mM, 20 µL

de AZA-1 a una concentración de 0.8 mM y 40 µL de OA/DTX1 una concentración 4.89 µM/0.62 µM, respectivamente.

### **Análisis de las muestras mediante LC-MS/MS**

Las muestras de toxinas lipofílicas fueron analizadas mediante Cromatografía líquida con espectrometría de masa LC-MS que consistió del cromatógrafo HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) acoplado al espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica ESI-TRAP Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del cromatógrafo HPLC se utilizó el programa ChemStation for LC 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) y para el control del espectrómetro se utilizó el programa esquire Control 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para la separación HPLC se utilizó una columna C18 de 50×2.1 mm, 3 µm y 120 Å (Hibar HR Purospher STAR, Merck KGaA, Alemania), conectándose directamente al espectrómetro de masas. La separación de 20 µL de solución mix de estándares y de muestras se realizó a temperatura ambiente por medio de una separación isocrática a un flujo de 0.1 mL/min utilizando 40% v/v de la fase ácido fórmico 50 mM/formato de amonio 2 mM preparada en agua (Fase A) y 60% v/v de la fase ácido fórmico 50 mM/formato de amonio 2 mM preparada en acetonitrilo 95% v/v y agua 5% (Fase B). El proceso de ionización (nebulización) mediante electrospray se realizó a 4000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una temperatura de 300°C, presión de 30 psi y flujo de 10 L/min.

Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron de acuerdo al siguiente programa:

Para OA/YTX tiempo, 0-7 min; monitoreo de reacción múltiple (MRM), m/z 803 y m/z 1141; polaridad negativa (segmento 1); para PTX2 tiempo, 7-9.3 min; MRM, m/z 877; polaridad, positiva (segmento 2); para AZA1 tiempo, 9.3-11.5 min; MRM, m/z 843; polaridad positiva (segmento 3) y para DTX1 tiempo, 11.5-15 min; MRM, m/z 817; polaridad negativa (segmento 4). (McNabb *et al.* 2005, Fux *et al.* 2007, These *et al.* 2009).

### **Análisis de cromatogramas y espectros/Identificación de señales**

Para el análisis de los cromatogramas y espectros se utilizó el programa DataAnalysis versión 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para la obtención de los cromatogramas de ion extraído (EIC) se utilizaron las transiciones (fragmentos característicos) de cada toxinas las que fueron: para AO las transiciones: m/z 803→255, m/z 803→563 y m/z 803→785, para YTX la transición: m/z 1141→1062, para PTX-2 la transición: m/z 877→823, para AZA-1 las transiciones: m/z 843→806, m/z 843→825 y para DTX1 utilizando las transiciones: m/z 817→255, m/z 817→563 y m/z 817→799. Para cada peak cromatográfico se determinó su espectro de masas correspondientes. (Gerssen *et al.* 2011)

### **Preparación de extractos para el análisis de toxinas paralizantes (VPM)**

A partir de las muestras recolectadas se extrajeron 100 g de tejido de los invertebrados, los que fueron homogenizados con 100 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y calentados a 80°C por 15 minutos evaluando el pH del homogeneizado, de forma constante, con el fin de mantener el rango de pH de 3 - 4.

Luego de esto, el homogeneizado se filtró y 25 ml de estos fueron almacenados para su evaluación cuantitativa por HPLC-FLD (Lagos 2002).

### **Análisis del Veneno Paralizante de Moluscos mediante HPLC-FLD**

Los estándares de STX, neoSTX y GTXs fueron adquiridos de “National Research Council Canadá”, NRC-Halifax, Canadá.

Las toxinas del VPM se analizaron un equipo HPLC compuesto por una bomba isocrática de alta presión (Shimadzu LC- 10AD) a un flujo constante de 0,7 ml/min de la fase móvil, un inyector Rheodyne 7725i (loop 20µl) y una columna de C-8 fase reversa (Waters, 150 x 4,6 mm, 5µm). La derivatización fue post-columna utilizando un agente oxidante con un flujo de 0.4 ml/min y ácido acético 500mM con un flujo de 0,4 ml/min, reacción que se lleva a cabo en una cámara de reacción con un coil de 10 m (0.5mm i.d.) a una temperatura controlada 65°C. La detección se realizó con un detector fluorescente (Jasco FP-2020 Plus) a una longitud de onda de excitación de 330nm y de emisión de 390nm. (Oshima 1995b, Lagos *et al.* 2002).

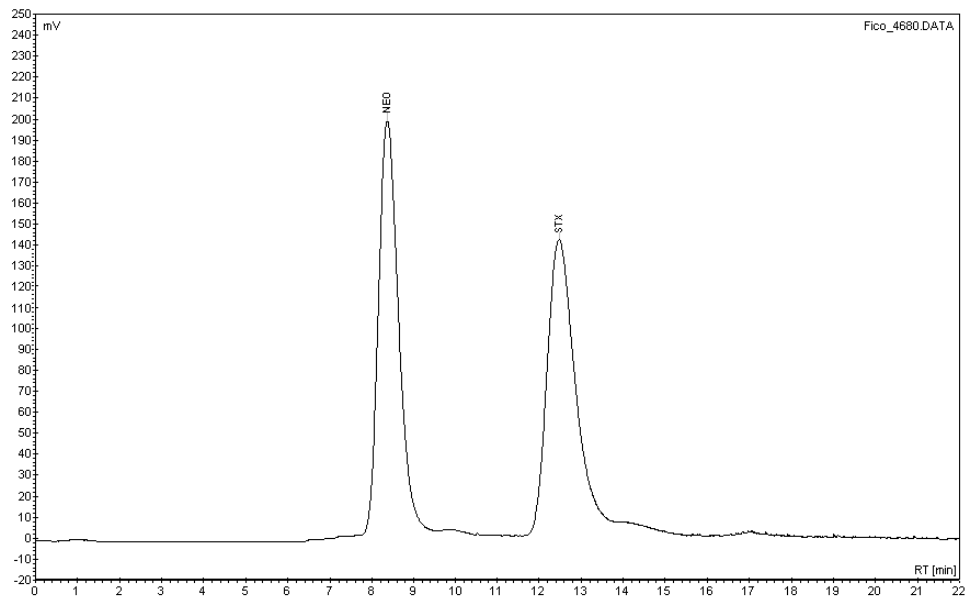
### **Determinación de las concentraciones de las toxinas del VPM**

Los parámetros evaluados por HPLC corresponden a los tiempos de retención ( $R_t$ ), los que son característicos para cada toxina bajo condiciones cromatográficas conocidas. La determinación de estos tiempos permitió definir el área integral de cada toxina identificada por fluorescencia, siendo su intensidad directamente proporcional a la masa de cada toxina. El cálculo de las concentraciones de las toxinas en las muestras fue realizada comparando el área del pico de cada toxina en los cromatogramas de las muestras con el área del pico de los estándares analíticos de cada toxina cuyas concentraciones son conocidas. (Lagos 2002, García *et al.* 2005)

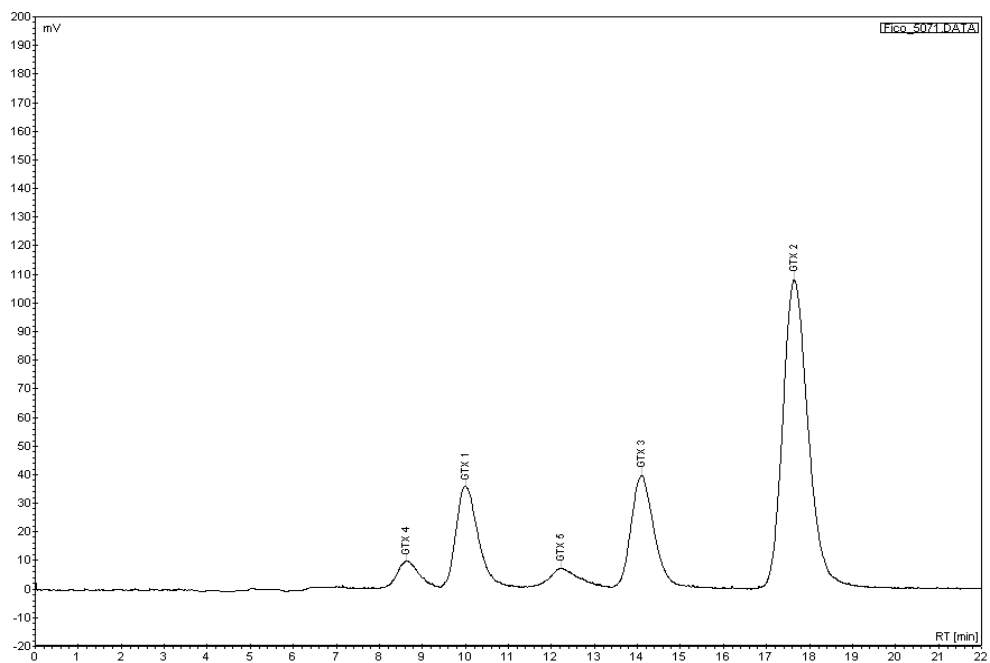
## RESULTADOS

### Toxinas paralizantes

La evaluación analítica de las toxinas paralizantes mediante el método de HPLC-FLD se interpreta desde las áreas bajo la curva generadas por cada pico cromatográfico. Los parámetros analizados corresponden a los tiempos de retención ( $R_t$ ), los que son característicos para cada toxina bajo condiciones cromatográficas conocidas, permitiendo definir el área integral de cada una de éstas identificada por fluorescencia, siendo su intensidad directamente proporcional a la masa de cada toxina. El cálculo de las concentraciones de las toxinas en las muestras se realiza comparando el área del pico de cada una en los cromatogramas de las muestras con el área del pico de los estándares analíticos de cada toxina cuyas concentraciones son conocidas. (Lagos 2002, García *et al.* 2005). De esta forma, en la figura 9 se aprecia un cromatograma del estándar de neoSaxitoxina (neoSTX) y Saxitoxina (STX) las toxinas involucradas en la contaminación de los bivalvos evaluados, mientras que en la figura 10, se aprecia el estándar analítico de Gonyautoxinas (GTX) con sus respectivos isómeros, GTX4/GTX1, GTX 5 y GTX3/GTX2.

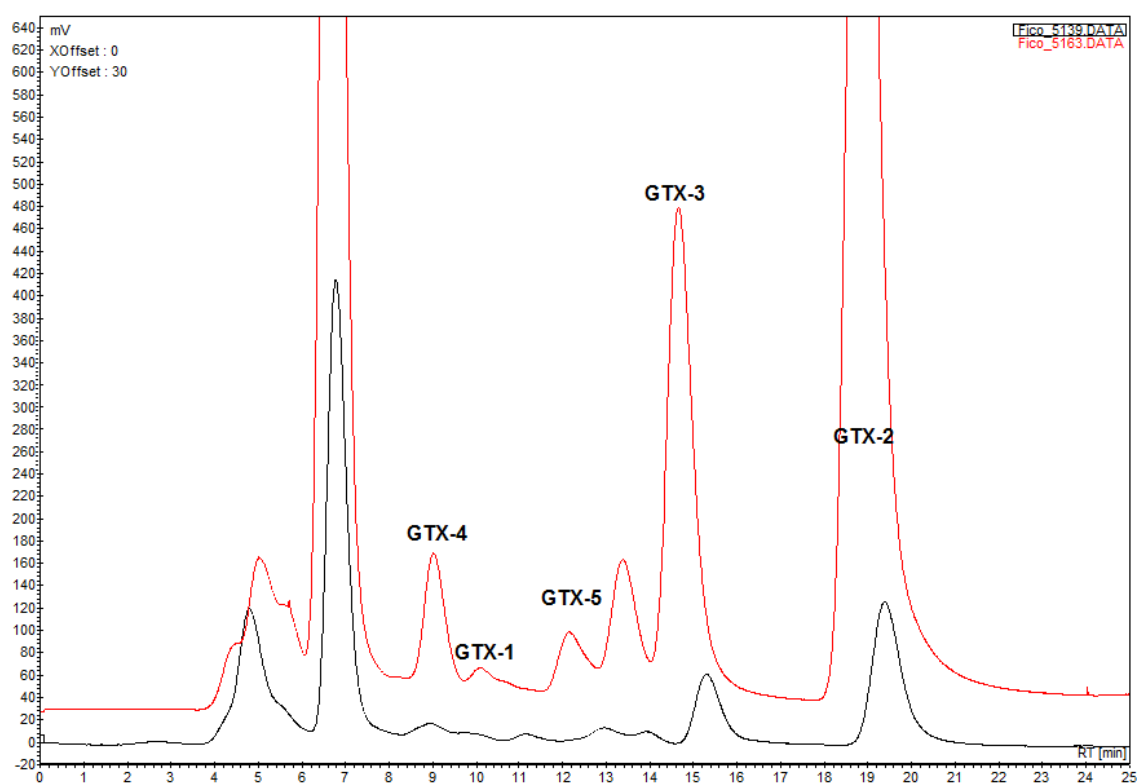


**Figura 9.** Cromatograma de HPLC-FLD del estándar de las toxinas paralizantes neoSTX ( $R_T$ : 8,5) y STX ( $R_T$ : 12,5).



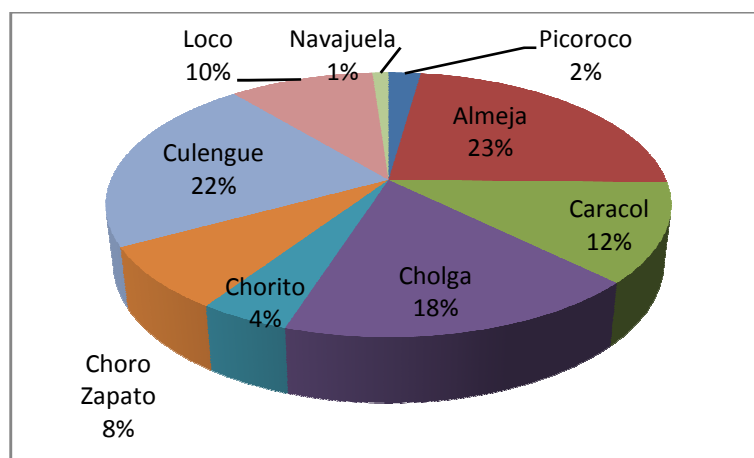
**Figura 10.** Cromatograma HPLC-FLD del estándar de toxinas paralizantes GTX-4 ( $R_T$ : 8,6), GTX-1 ( $R_T$ : 10,1), GTX-5 ( $R_T$ : 12,3), GTX-3 ( $R_T$ : 14,2), GTX-2 ( $R_T$ : 17,8).

Además, la figura 11 representa un cromatograma obtenida desde las especies *Gari solida* (rojo) y de *Austromegabalanus psittacus* (negro), en las que se identifican las Gonyautoxinas. Siguiendo esta metodología se evaluaron, analizaron y cuantificaron todas las muestras provenientes del sector de Islas Huichas, Puerto Aguirre, Región de Aysén.



**Figura 11.** Cromatograma HPLC-FLD de una muestra de *Gari solida* (rojo) y *Austromegabalanus psittacus* (negro), positivo a GTXs, obtenidas desde el sector de Islas Huichas, Región de Aysén.

Las muestras recolectadas en el sector de Islas Huichas, correspondieron a 35 estaciones de muestreo (figura 8), la que contabilizaron un total de 91 muestras, representadas por las siguientes especies: bivalvos filtradores: Almejas (*Venus antiqua*), Cholgás (*Aulacomya ater*), Culengues (*Gari solida*), Choritos (*Mytilus edulis chilensis*), Choro zapato (*Choromytilus chorus*) y Navajuela (*Tagelus dombeii*), gasterópodos: Loco (*Concholepas concholepas*), Caracol del sur (*Argobuccinum ranelliformes*) y el crustáceo cirrípedo comúnmente conocido como Picoroco (*Austromegabalanus psittacus*). De estas especies la abundancia se distribuyó de la siguiente forma: Almejas (23%), Culengues (22%), Cholgás (18%), Choro zapato (8%), Choritos (4%), Navajuela (1%), Caracol del sur (12%), Loco (10%) y Picoroco (2%), situación que se aprecia en la figura 12, siendo la población de bivalvos filtradores las más representativas en todas las zonas evaluadas.



**Figura 12.** Porcentaje de abundancia de las especies recolectadas en Islas Huichas, Región de Aysén.

Los valores determinados y cuantificados de STX equivalentes/100g de carne detectados con la técnica de HPLC con derivatización post-columna y detección fluorescente, determinó que las muestras de mariscos sobrepasaron en un 82,4% la norma establecida de 80 µg STX eq/100 g de carne de molusco. Mientras que el 17,6% restante se se detectó por debajo de la norma, definiéndose como aptos para la explotación y consumo de los recursos. De entre todas las especies muestreadas, las toxicidades más altas se encontraron en el Culengue (*Gari solida*) y Caracol del sur (*Argobuccinum ranelliformes*), donde el 100 % de las muestras evaluadas sobrepaso la norma, alcanzando niveles ponderados de 7.092 µg STX eq/100 g y 4.955 µg STX eq/100 g respectivamente. Por otro lado, los niveles de STX equivalentes encontrados en las muestras de picorocos (*Austromegabalanus psittacus*) alcanzaron valores máximos de 60 µg STX eq/100 g (tabla 3).

**Tabla 3.** Toxicidad del VPM en el universo de muestras recolectadas en Islas Huichas, expresadas en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g. SEM = Error estándar, N = n° de muestras.

<b>Especie</b>	<b>(%) Bajo la norma.</b>	<b>(%) Sobre la norma.</b>	<b>Rangos de toxicidades <math>\mu\text{g}</math> STX eq/100 g <math>\pm</math> SEM</b>
<i>A. psittacus</i>	100	0	30 $\pm$ 30 (N= 2)
<i>V. antiqua</i>	14	86	452,7 $\pm$ 195,3 (N= 21)
<i>C. concholepas</i>	44	56	204,6 $\pm$ 111,6 (N= 9)
<i>A. ater</i>	0	100	423,3 $\pm$ 101,6 (N= 16)
<i>A. ranelliformes</i>	0	100	1850,4 $\pm$ 452,2 (N= 11)
<i>G.solida</i>	0	100	2505,3 $\pm$ 362,8 (N= 20)
<i>M. edulis chilensis</i>	50	50	1138 $\pm$ 1022,6 (N= 4)
<i>C. chorus</i>	71	29	55,1 $\pm$ 14,2 (N= 7)
<i>T. dombeii</i>	0	100	99

## Perfil de toxinas paralizantes en Bivalvos

### *Venus antiqua* (Almeja)

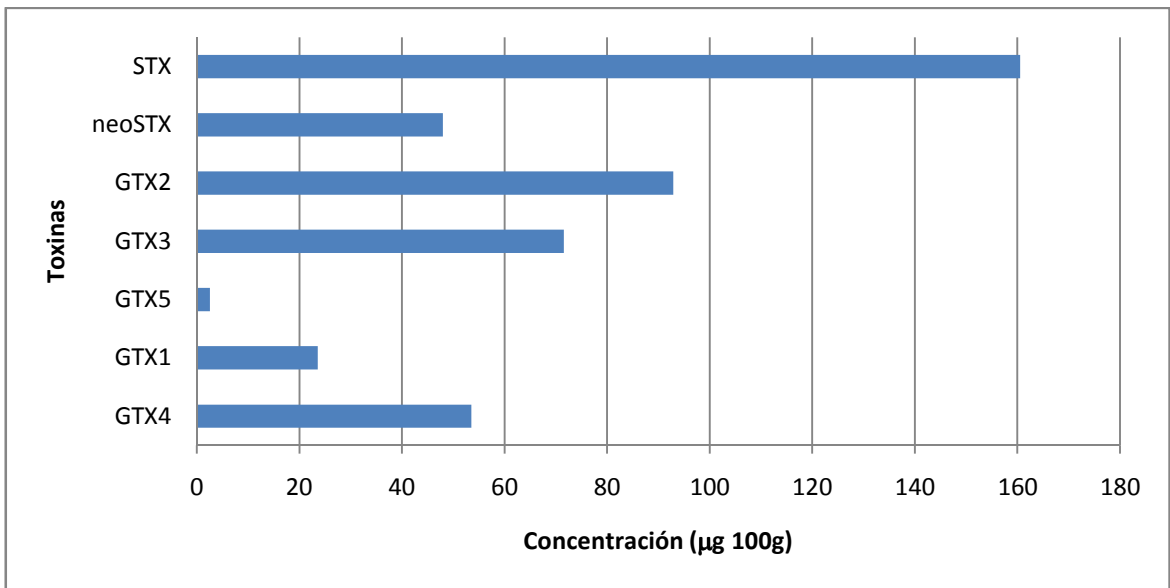
De las 21 muestras recolectadas de *V. antiqua* en las diferentes estaciones de muestreo, todas presentaron toxicidad, siendo la más alta detectada a la correspondiente en el sector de la Isla Luchín (zona 22) con un valor promedio de 4.235  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g, mientras que la concentración más baja fue detectada en Isla Ñancul (zona 21) con una concentración de 37  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g (tabla 4). La determinación del perfil de GTXs presentes en esta especie, definió que estos isómeros eran los más abundantes en los tejidos del bivalvo, aportando el 53,4 % de la concentración final, mientras que neoSTX y STX presentes también, sólo aportaban con un 10,6% y 35,5% de la toxicidad total, respectivamente situación que se aprecia en la figura 13. Dentro de las GTXs, GTX-2 y GTX-4 presentaron a una concentración superior a sus epímeros GTX-3 y GTX-1 respectivamente. Esta situación se aprecia en Isla Luchín correspondiente a la zona 22 (45.044544s, 73.422865w). Los máximos valores detectados para GTXs fueron los siguientes: GTX-4: 1.099  $\mu\text{g}/100$  g, (zona 22); GTX-1: 452  $\mu\text{g}/100$  g, (zona 22); GTX-5: 21  $\mu\text{g}/100$  g, (zona 8); GTX-3: 1.042  $\mu\text{g}/100$  g, (zona 22) y GTX-2: 1.572  $\mu\text{g}/100$  g, (zona 22). Por otro lado, neoSTX y STX alcanzaron valores de 658  $\mu\text{g}/100$  g (zona 2) y de 514  $\mu\text{g}/100$  g (zona 4) respectivamente.

En la figura 13 se aprecia el perfil promedio de toxinas paralizantes detectadas y analizadas en la especie. En ella se aprecia que la mayor concentración de

toxina corresponde a el isómero STX, con un valor promedio de 161  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g, mientras que el valor promedio para las otras toxinas fue de 54  $\mu\text{g}$ /100 g (GTX-4), 24  $\mu\text{g}$ /100 g (GTX-1), 3  $\mu\text{g}$ /100 g (GTX-5), 72  $\mu\text{g}$ /100 g (GTX-3), 93  $\mu\text{g}$ /100 g (GTX-2) y de 48  $\mu\text{g}$ /100 g para neoSTX.

**Tabla 4.** Perfil de toxinas y toxicidades de *Venus antiqua* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )							Toxicidad total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
1	Isla Vergara	45.198162s	73.537395w	n.d	n.d	n.d	2	1	n.d	101	103
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	n.d	n.d	2	8	3	658	296	967
3	Isla Viel	45.201836s	73.592.660	n.d	n.d	3	35	3	170	340	550
4	Isla Viel	45.192896s	73.586825w	n.d	n.d	n.d	17	8	135	514	674
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d	n.d	8	6	4	n.d	139	156
8	Islas Herraduras	45.181588s	73.476987w	25	24	21	17	14	45	203	349
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d	n.d	15	8	7	n.d	46	75
11	Islas Herraduras	45.181452s	73.460608w	n.d	n.d	2	11	7	n.d	317	337
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d	n.d	2	11	18	n.d	47	78
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	n.d	n.d	1	9	15	n.d	239	263
20	Punta Olea	45.043770s	73.467782w	n.d	n.d	n.d	28	29	n.d	159	216
21	Isla Ñancul	45.038287s	73.437435w	n.d	n.d	n.d	3	6	n.d	29	37
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	1099	452	n.d	1042	1572	n.d	70	4235
24	Isla Hilda	45.079594s	73.446156w	1	20	n.d	n.d	3	n.d	271	294
26	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d	n.d	n.d	32	30	n.d	49	110
27	Isla Merinea	45.249272s	73.604551w	n.d	n.d	n.d	34	30	n.d	107	170
28	Isla Atenais	45.241406s	73.581214w	n.d	n.d	n.d	8	17	n.d	114	139
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d	n.d	n.d	56	30	n.d	89	175
31	Isla Pilcomayo	45.228222s	73.533564w	n.d	n.d	n.d	59	45	n.d	87	192
32	Isla Pilcomayo	45.234422s	73.525405w	n.d	n.d	n.d	53	72	n.d	74	198
35	Isla Vergara	45.178624s	73.521049w	n.d	n.d	n.d	65	38	n.d	82	186



**Figura 13.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Venus antiqua*, de concentración promedio de 453 µg STX eq /100 g.

### ***Aulacomya ater* (Cholga)**

Las toxicidades detectadas y cuantificadas en las muestras de Cholgas de las distintas zonas de muestreo, evidenció que el 100% de las muestras sobrepasaron la norma establecida de 80  $\mu\text{g}$  de STX equivalente por 100 g de carne de moluscos con valores que fluctuaron entre los 169 y 1.789  $\mu\text{g}$  STX eq /100 g (tabla 5). Los perfiles tóxicos de las 16 muestras, determinaron una alta presencia de STX la que dominó en la mayoría de los casos con valores que alcanzaron los 1.755  $\mu\text{g}/100$  g (Punta Riel, 45.194944s, 73.396193w), situación que también se aprecia en la figura 14.

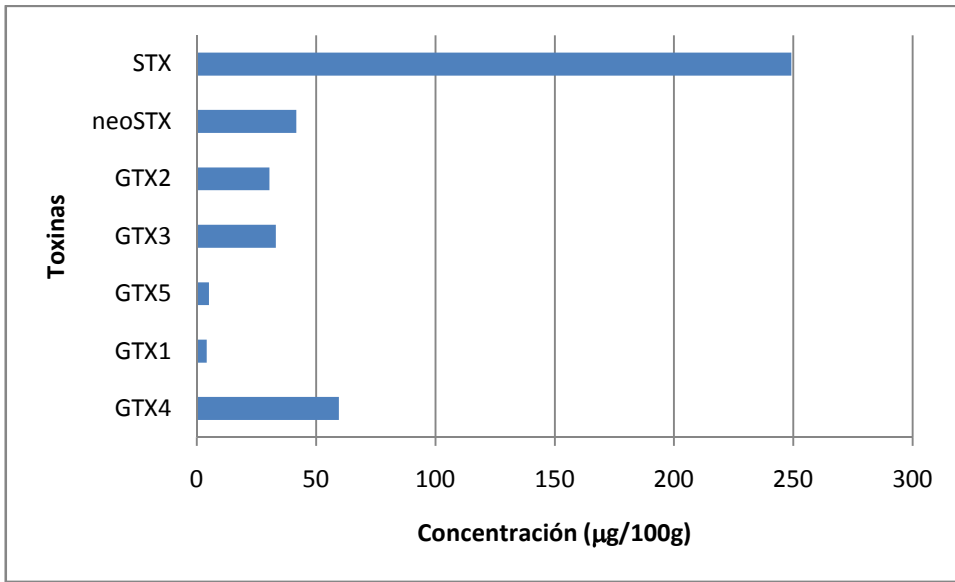
GTXs aportaron el 31,2% de la toxicidad promedio, de estas GTX-3/GTX-2 se presentaron en la totalidad de los análisis, siendo GTX-3 levemente superior a GTX-2. En el caso de los epímeros GTX-4/GTX-1, GTX-4 mostró una mayor concentración en los perfiles encontrados en las zonas 8, 12, 14, 15, 17 y 18 alcanzando valores de hasta 456  $\mu\text{g}/100$  g. El isómero GTX-5, presentó niveles superiores a isómeros respectivos en las zonas 6 y 8, lo que la hace predominar en el perfil tóxico de dichas zonas (tabla 5)

Por otro lado, neoSTX se detectó en 11 estaciones de muestreo, cuyo valor más alto fue de 149  $\mu\text{g}/100\text{g}$  en Isla Herraduras, zona 8 (45.181588s, 73.476987w), sin embargo, su aporte al perfil promedio no supera el 9,9%.

**Tabla 5.** Perfil de toxinas y toxicidad en *Aulacomya ater* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	n.d	n.d	3	24	19	n.d	257	303
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d	n.d	22	13	15	n.d	125	176
8	Islas Herraduras	45.181588s	73.476987w	29	16	23	7	17	n.d	145	237
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d	n.d	2	6	8	149	57	222
12	Islas Herraduras	45.174903s	73.446989w	75	13	5	15	21	46	171	345
13	Punta Riel	45.194944s	73.396193w	n.d	n.d	9	9	5	11	1755	1789
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	40	14	5	13	32	23	42	169
15	Punta Riel	45.195302s	73.343199w	28	11	6	16	31	21	66	179
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d	n.d	4	14	24	32	118	193
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	456	4	4	14	24	38	128	667
18	Isla Julian	45.109127s	73.513445w	325	8	n.d	44	28	78	207	689
20	Punta Olea	45.043770s	73.467782w	n.d	n.d	1	11	18	99	142	270
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	n.d	n.d	n.d	25	47	135	473	680
25	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d	n.d	n.d	44	41	36	128	250
33	Puerto Rosita	45.233380s	73.497803w	n.d	n.d	n.d	113	66	n.d	97	276
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	n.d	n.d	n.d	160	93	n.d	76	329

La figura 14 muestra el perfil promedio de toxinas encontrados en este recurso el cual está dominado por la STX cuyo valor promedio fue de  $249\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ . Por otro lado, se aprecia que GTX-4 supera a su epímero GTX-1 a concentraciones de  $60\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  y  $4\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  respectivamente, situación que se repite en menor proporción con los epímeros GTX-3 ( $33\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y GTX-2 ( $30\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ ). La toxina GTX-5 presentó una concentración de  $5\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  y neoSTX de  $42\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ .



**Figura 14.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Aulacomya ater* con una concentración promedio de 423 µg STX eq/100 g.

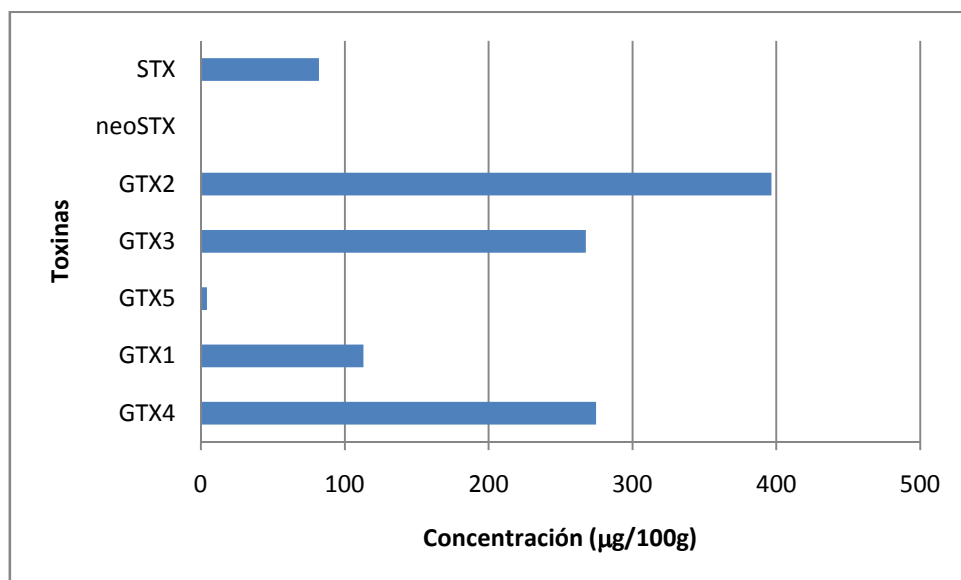
### ***Mytilus edulis chilensis* (Chorito)**

Las muestras analizadas de *M. edulis chilensis* determinaron toxicidades que estuvieron por sobre la norma (261 y 4.202  $\mu\text{g STX eq}/100\text{g}$ ), y por debajo de esta (tabla 6). La composición de toxinas determinó la presencia recurrente de los isómeros STX y GTX-3/GTX-2 aún cuando perfiles adyacentes de otras zonas determinar la presencia de GTX-4/GTX-1 (1.561  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y en un caso aislado de GTX-5 (16  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) en Islote la Garza (45.227354s, 73.617837w). Por otro lado, no se detectó el isómero neoSTX en ninguna de las zonas evaluadas, siendo la muestra representada en su mayoría por los isómeros de GTXs, siendo GTX-2 la de mayor concentración ( $\mu\text{g STX eq}/100\text{g}$ ) como se aprecia en la figura 15, por lo que la toxicidad de las muestras estaba dada principalmente por este tipo de toxinas.

**Tabla 6.** Perfil de toxinas y toxicidad en *Mytilus edulis chilensis* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g STX eq}/100\text{ g}$ .

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d	n.d	n.d	19	12	n.d	230	261
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d	n.d	16	9	2	n.d	n.d	28
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	1099	452	n.d	1042	1572	n.d	37	4202
25	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	61	61

La figura 15 muestra el perfil promedio de *M. edulis chilensis* en donde los máximos valores estuvieron dominados por las GTXs, siendo GTX-2 la de más alta concentración (397  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ). Los valores promedio de las otras toxinas fueron de 275  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (GTX-4), 113  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (GTX-1), 4  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (GTX-5), 268  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (GTX-3) y de 82  $\mu\text{g}/100\text{g}$  en STX. No se detectó la presencia de neoSTX en ninguna de las muestras.



**Figura 15.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Mytilus edulis chilensis* con un valor promedio de 1.138  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

### ***Choromytilus chorus* (Choro Zapato)**

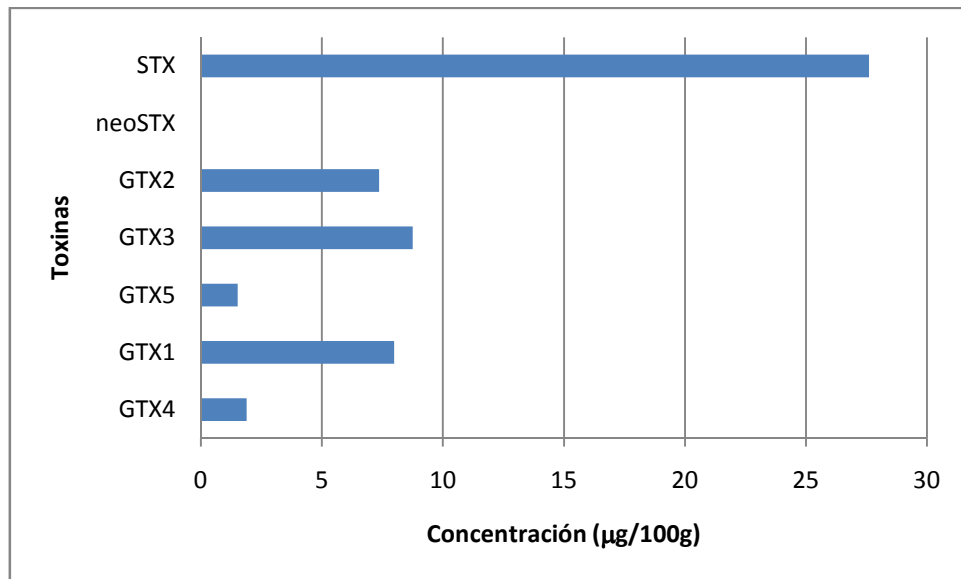
Los análisis realizados a las muestras del recurso Choro Zapato manifestaron bajas toxicidades en comparación a los otros recursos evaluados. La toxicidad más relevante se detectó en Isla Herraduras, zona 7 (45.175410s, 73.477686w) con un valor de 115  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g y Punta Riel (zona 14) zonas que destacaron por sobrepasar la norma sanitaria nacional (tabla 7). De todas las toxinas analizadas STX estuvo presente en un 85,7%, siendo la de mayor concentración dentro de los perfiles tóxicos, alcanzando niveles de 61 $\mu\text{g}$ /100 g (Isla Herraduras (45.175410s, 73.477686w). Por otro lado, neoSTX no se detectó e identificó en ninguno de los análisis realizados.

Los epímeros GTX-4/GTX-1 sólo se detectaron en la zona 7 y 14 (28,6%), en una relación promedio de 1:4, a diferencia de GTX-3/GTX-2 que se detectaron en la totalidad de las muestras, manteniendo una relación entre éstas de 9:7. La toxina GTX-5 sólo se detectó en la zona 7, en cuyo perfil su concentración fue de 11  $\mu\text{g}$ /100 g.

**Tabla 7.** Perfil de toxinas y toxicidades de *Choromytilus chorus* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}$ /100 g)							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
7	Islas Herraduras	45.175410s	73.477686w	11	8	11	7	18	n.d	61	115
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d	n.d	n.d	2	7	n.d	16	25
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	3	48	n.d	34	15	n.d	n.d	99
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d	n.d	n.d	3	3	n.d	27	34
29 a	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d	n.d	n.d	11	4	n.d	14	28
29 b	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d	n.d	n.d	1	3	n.d	22	26
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	n.d	n.d	n.d	3	2	n.d	53	59

La figura 16 muestra el perfil característico de *Choromytilus chorus* en el sector bajo estudio de Islas Huichas, Región de Aysén. El perfil estuvo dominado por STX con un valor promedio de  $28 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  (50%) y por las GTXs cuyo valor combinado fue de  $28 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ . La única toxina que no se detectó fue neoSTX.



**Figura 16.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Choromytilus chorus* con una concentración promedio de 55 µg STX eq/100 g.

### ***Gari solida* (Culengue)**

Uno de los recursos más abundantes en las zonas de muestreo correspondió a *Gari solida*, presentando además las mayores toxicidades en comparación a los otros recursos (tabla 8). El 100% de las muestras analizadas están por sobre la norma de regulación sanitaria (80 microgramos de STX equivalente por 100 gramos de marisco), alcanzando valores máximos de 7.092  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g en Punta Quintana (45.199729s, 73.513791w; zona 34). Los perfiles detectados varían de un sector a otro, sin embargo, las toxinas que detectaron en mayor proporción correspondieron a GTXs, las cuales se identificaron en la totalidad de las muestras, aportando así a la mayor concentración ( $\mu\text{g}/100$  g). La proporción de las toxinas dentro del total del análisis fue el siguiente: STX (17,4%), GTX-3/GTX-2 (49,7%), GTX-4/GTX-1 (28,1%), GTX-5 (2,6%) y neoSTX (2,2%). Por otro lado, las toxinas GTX-2 y GTX-4 mostraron mayores concentraciones en relación a sus epímeros GTX-3 y GTX-1 respectivamente. En la zona 34 se encontraron los niveles más altos de GTXs, cuyos valores fueron de: GTX-4 (2.364  $\mu\text{g}/100$  g), GTX-1 (154  $\mu\text{g}/100$  g), GTX-5 (n.d), GTX-3 (2.441  $\mu\text{g}/100$  g), GTX-2 (1.626  $\mu\text{g}/100$  g), neoSTX (56  $\mu\text{g}/100$  g) y STX (452  $\mu\text{g}/100$  g) los que coinciden con la máxima toxicidad de las muestras (7.092  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g), situación que se aprecia en la figura 17.

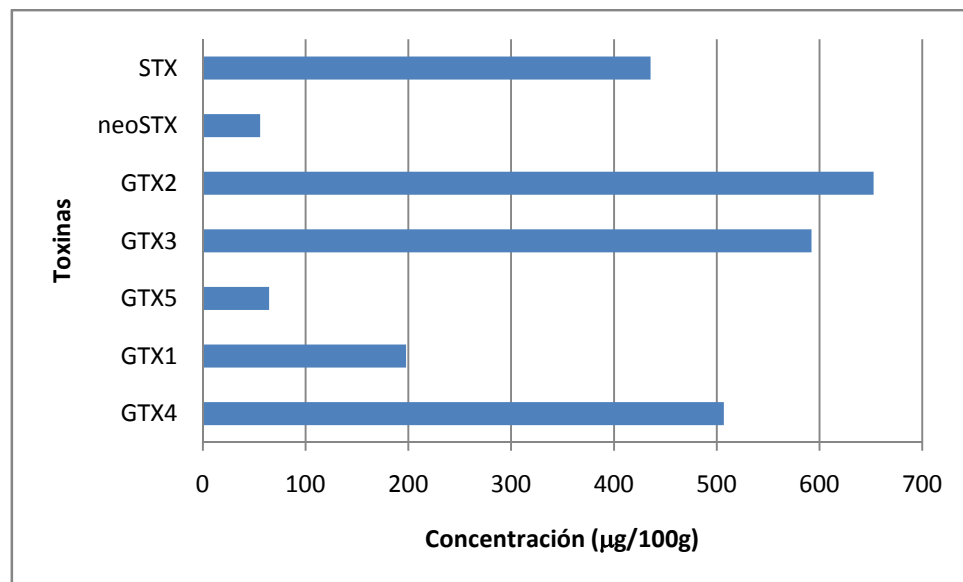
**Tabla 8.** Perfil de toxinas y toxicidad en *Gari solida* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
4	Isla Viel	45.192896s	73.586825w	209	57	67	170	174	n.d	n.d	678
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	453	22	155	167	236	21	791	1846
7	Islas Herraduras	45.175410s	73.477686w	259	400	569	n.d	n.d	684	210	2122
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d	n.d	60	35	40	n.d	564	700
10	Islas Herraduras	45.184425s	73.464562w	192	165	83	148	296	n.d	583	1467
11	Islas Herraduras	45.181452s	73.460608w	324	146	48	175	202	n.d	377	1271
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	153	178	n.d	783	722	61	58	1954
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	157	347	85	181	414	n.d	799	1981
19	Isla Julian	45.103844s	73.510936w	766	689	n.d	629	413	n.d	452	2949
20	Punta Olea	45.043770s	73.467782w	943	262	172	354	n.d	n.d	666	2398
21	Isla Ñancul	45.038287s	73.437435w	n.d	n.d	49	132	261	n.d	204	645
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	1099	452	n.d	1042	1572	63	281	4510
26	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d	n.d	n.d	133	982	232	583	1930
27	Isla Merinea	45.249272s	73.604551w	785	130	n.d	747	1195	n.d	141	2998
28	Isla Atenais	45.241406s	73.581214w	1051	73	n.d	951	1047	n.d	617	3739
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d	n.d	n.d	379	486	n.d	275	1140
30	Isla Costa	45.241370s	73.567984w	370	234	n.d	907	710	n.d	769	2989
31	Isla Pilcomayo	45.228222s	73.533564w	648	263	n.d	884	913	n.d	344	3051
32	Isla Pilcomayo	45.234422s	73.525405w	368	380	n.d	1940	1763	n.d	549	5001
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	2364	154	n.d	2441	1626	56	452	7092

neoSTX se detectó en las zonas 6, 7, 16, 22, 26 y 34 (tabla 9), siendo la zona 7 que corresponde a la Isla Herraduras (45.175410s, 73.477686w) el lugar donde presentó toxicidades por sobre su promedio (684  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), y al igual que la zona 16, el valor de neoSTX fue mayor al de STX. El isómero STX alcanzó valores máximos de 799  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  en la Isla Julián (zona 17; 45.114503s, 73.502580w) y

un valor mínimo de 58  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  en el Islote los Amigos (zona 16 (45.124865s, 73.497396w)).

La figura 17 muestra el perfil promedio de toxinas paralizantes de esta especie, en el se puede apreciar la altas concentraciones de GTXs las que dominan en el perfil, aportando el 80,3% de la toxicidad total, mientras que neoSTX aporta el 2,2% y STX el 17,4%. Las concentraciones promedio detectadas corresponden a: 507  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-4), 198  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-1), 64  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-5), 592  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-3), 653  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-2), 56  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (neoSTX) y de 436  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  para STX.



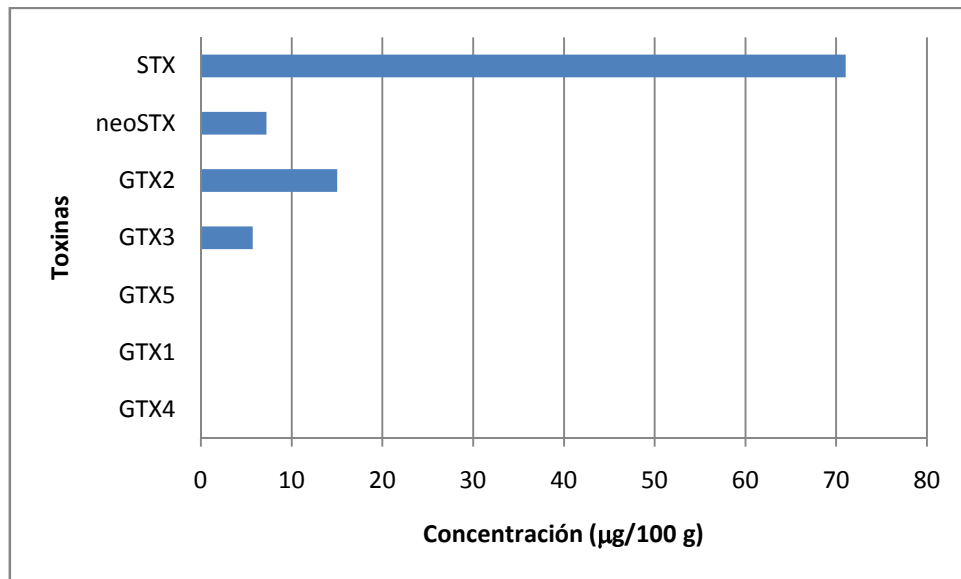
**Figura 17.** Perfil tóxico promedio cuantitativo y cualitativo de toxinas paralizantes en *Gari solida* con una toxicidad promedio de 2.505  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

### ***Tagelus dombeii* (Navajuela)**

Las muestras recolectadas de *T. dombeii* provenientes de Isla Luchín (45.044544s, 73.422865w; zona 22; figura 8), presento una toxicidad de 99  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g (tabla 9). En la evaluación individual de las toxinas se puede apreciar que STX fue la toxina con los niveles más altos detectados (71  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ). Por otro lado, el perfil de los isómeros y epímeros de GTXs, determinó que GTX-2 se detectara en una mayor concentración y/o proporción con respecto a su epímero GTX-3, con concentraciones de 15 y 6,0  $\mu\text{g}/100$  g respectivamente. A su vez, neoSTX alcanzó un nivel de 7,0  $\mu\text{g}/100$  g, situación que se aprecia en la figura 18. Cabe destacar, que en el perfil evaluado, no se detectó ni identificó los isómeros de toxinas pertenecientes a GTX-4/GTX-1 y GTX-5.

**Tabla 9.** Perfil de toxinas y toxicidad en *Tagelus dombeii* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada).  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ )							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	n.d	n.d	n.d	6	15	7	71	99



**Figura 18.** Perfil tóxico de toxinas paralizantes determinada en *Tagelus dombeii* colectada en Isla Luchín (45.044544s, 73.422865w), con una toxicidad total de 99 µg STX eq/100 g.

## **Perfil de toxinas paralizantes en Gasterópodos**

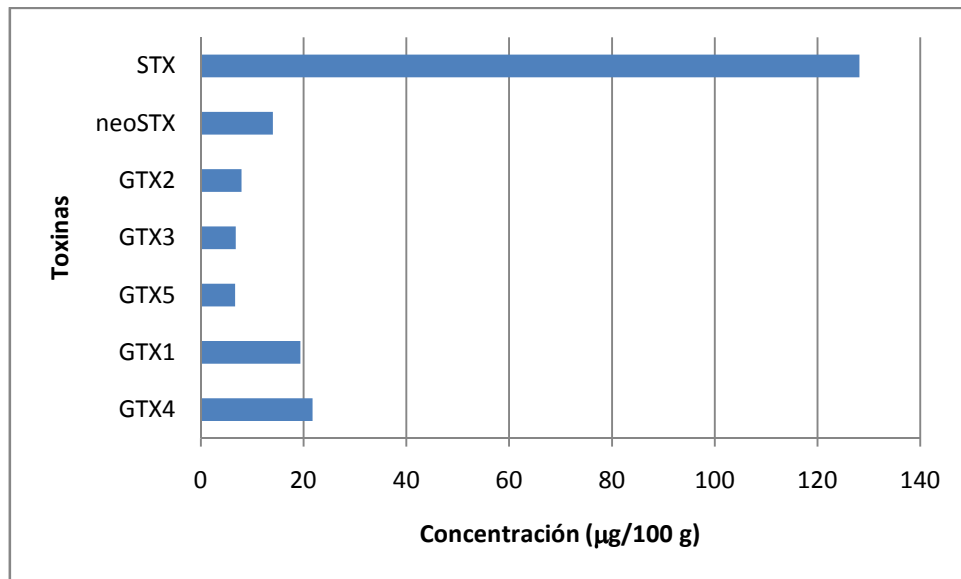
### ***Concholepas concholepas* (Loco)**

Los análisis realizados a las muestras de Loco (*C. concholepas*) determinaron toxicidades entre 12  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g (Isla Viel, zona 2) y 1.079  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g (Islote la Garza, zona 6). STX fue la toxina dominante en todos los perfiles estudiados, promediando valores de 882  $\mu\text{g}/100$  g (tabla 10) y aportando el 62,4% de la toxicidad total en los perfiles analizados. En el grupo de las GTXs, los epímeros GTX-3/GTX-2 se detectaron en todos los análisis a bajas concentraciones, mientras que GTX-4/GTX-1 se detectó únicamente en las muestras provenientes de la zona 6, 7 y 13. Además, el isómero GTX-5 se detectó en 4 de las 9 zonas (tabla 10) y destacan los sectores 5, 6 y 7 en donde esta superó en concentración a las otras GTXs.

**Tabla 10.** Perfil de toxinas y toxicidad en *C. concholepas* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	n.d	n.d	3	4	5	n.d	n.d	12
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d	n.d	20	6	7	74	60	167
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	15	165	9	5	3	n.d	882	1079
7	Islas Herraduras	45.175410s	73477686w	129	6	28	1	1	n.d	25	190
13	Punta Riel	45.194944s	73.396193w	51	3	n.d	1	3	n.d	44	102
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	n.d	n.d	n.d	4	7	n.d	15	27
18	Isla Julian	45.109127s	73.513445w	n.d	n.d	n.d	1	3	52	115	172
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	n.d	n.d	n.d	11	29	n.d	n.d	41
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d	n.d	n.d	27	13	n.d	12	51

El perfil tóxico de la especie determinado para el sector de Islas Huichas, se muestra en la figura 19. En él se aprecia la alta concentración de STX con 128  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . La concentración promedio de la toxina GTX-2 (8,0  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), ligeramente superior a su epímero GTX-3 (7,0  $\mu\text{g}/100$ ), mientras que la de GTX-4 (22  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) fue superior a GTX-1 (19  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). La concentración de GTX-5 fue de 7,0  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , en tanto que neoSTX obtuvo una concentración de 14  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ .



**Figura 19.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Concholepas concholepas* cuya toxicidad total es de 205 µg STX eq/100 g.

***Argobuccinum ranelliforme* (Caracol del sur).**

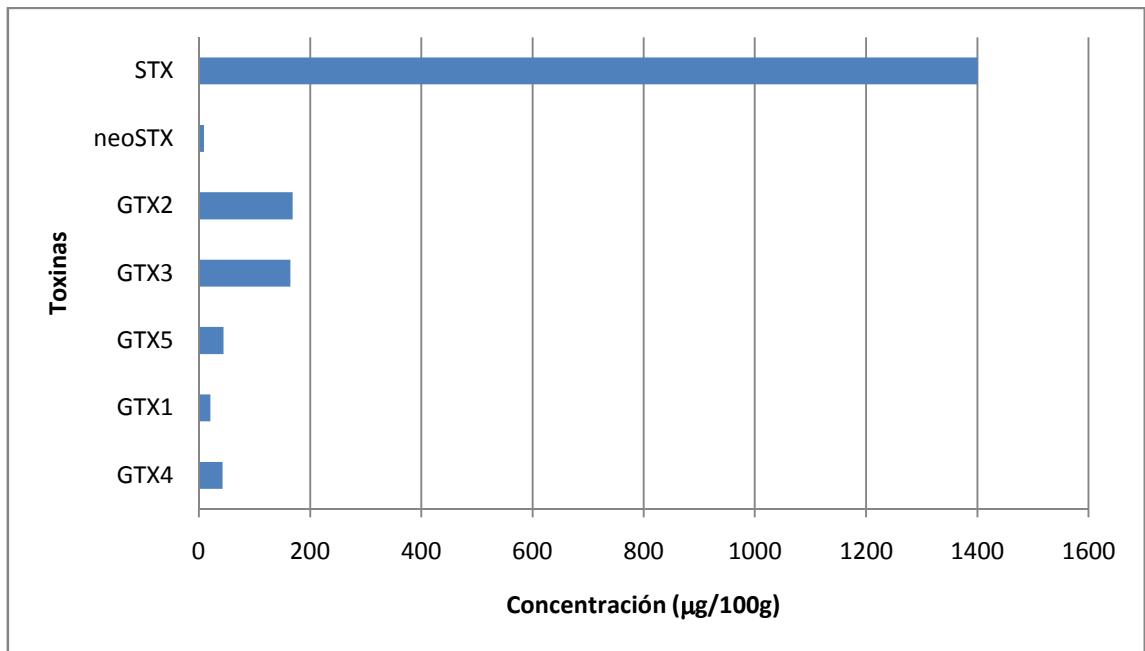
En las muestras recolectadas del gasterópodo carnívoro *Argobuccinum ranelliformes*, se aprecia una alta toxicidad en todas las muestras. Los niveles de STX equivalente más altos se detectaron en la zona 3, correspondiente a la Isla Viel (45.201836s, 73.592660w) cuyos valores alcanzaron niveles de 4.955  $\mu\text{g}$  STXeq/100 g de carne, mientras que la más baja se encontró en la zona 14, Punta Riel (45.190166s, 73.358193w) cuyo valor fue de 179  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g (tabla 11). El perfil tóxico promedio de las muestras (figura 20) determinó que la toxina con mayor presencia correspondió a STX la que presentó un 75,7% de la concentración total por sobre neoSTX y GTXs las que sólo aportan el 0,5% y 31,3% respectivamente. A pesar que las toxinas GTX-3/GTX-2 se detectaron en el 100% de las muestras, su aporte al perfil de toxinas no supera al 18%. Además, GTX-4 y GTX-1 sólo se detectaron en la Isla Herraduras, zona 9 (45.186551s, 73.472231w) promediando valores de 467  $\mu\text{g}/100$  g para GTX-4 y de 225  $\mu\text{g}/100$  g para GTX-1. Un dato relevante, fue la detección y cuantificación de GTX-5, la que se detectó en las zonas 2, 3, 5, 6, 9, 17 y 18 a concentraciones que sobrepasaron en algunos casos, los niveles de otras toxinas presentes.

Por otro lado, neoSTX se detectó en tan solo 2 estaciones de muestreo las que corresponde a Punta Riel (zona14) y Punta Quintana (zona 34), cuyos valores fueron de 35 y 69  $\mu\text{g}/100$  g de carne respectivamente.

**Tabla 11.** Perfil de toxinas y toxicidad en *Argobuccinum ranelliforme* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )							Toxicidad Total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	n.d	n.d	21	43	64	n.d	2585	2713
3	Isla Viel	45.201836s	73.592660w	n.d	n.d	36	212	152	n.d	4554	4955
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d	n.d	53	154	213	n.d	1715	2135
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d	n.d	24	7	23	n.d	3575	3628
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	467	225	332	117	250	n.d	351	1741
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	n.d	n.d	n.d	5	36	35	104	179
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d	n.d	n.d	601	496	n.d	712	1809
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	n.d	n.d	13	122	176	n.d	237	548
18	Isla Julian	45.109127s	73.513445w	n.d	n.d	7	82	62	n.d	290	441
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	n.d	n.d	n.d	29	39	n.d	241	309
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	n.d	n.d	n.d	437	343	69	1047	1896

La figura 20, muestra el perfil tóxico promedio de las las toxinas paralizantes encontradas en *A. ranelliformes*, el cual estuvo dominado por la STX, cuya concentración promedio fue de  $1.401\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (figura 20). La toxina con la menor concentración promedio fue neoSTX con un valor de  $9,0\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ . La concentración promedio para las otras toxinas fue de  $42\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-4),  $20\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-1),  $44\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-5),  $164\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (GTX-3) y de  $169\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  para GTX-2.



**Figura 20.** Perfil tóxico promedio de toxinas paralizantes determinada en *Argobuccinum ranelliforme* con una concentración promedio de 1.850 µg STX eq /100 g.

## Perfil de toxinas paralizantes en crustáceos

### *Austromegabalanus psittacus* (Picoroco)

De las 2 muestras recolectadas de la especie *A. psittacus*, sólo la obtenida en la zona 29 correspondiente a Isla Atenais (tabla 12) constato una toxicidad por debajo de la norma de 80 µg STX eq/100 g. La única toxina encontrada en el perfil de *A. psittacus* correspondió al isómero STX, con un valor de 60 µg/100g.

**Tabla 12.** Perfil de toxinas y toxicidad de la especie *Austromegabalanus psittacus* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Toxicidad total expresada en µg STX eq/100 g.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas (µg/100 g)							Toxicidad total
				GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	STX	
1	Isla Vergara	45.198162s	73.537395w	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	60	60

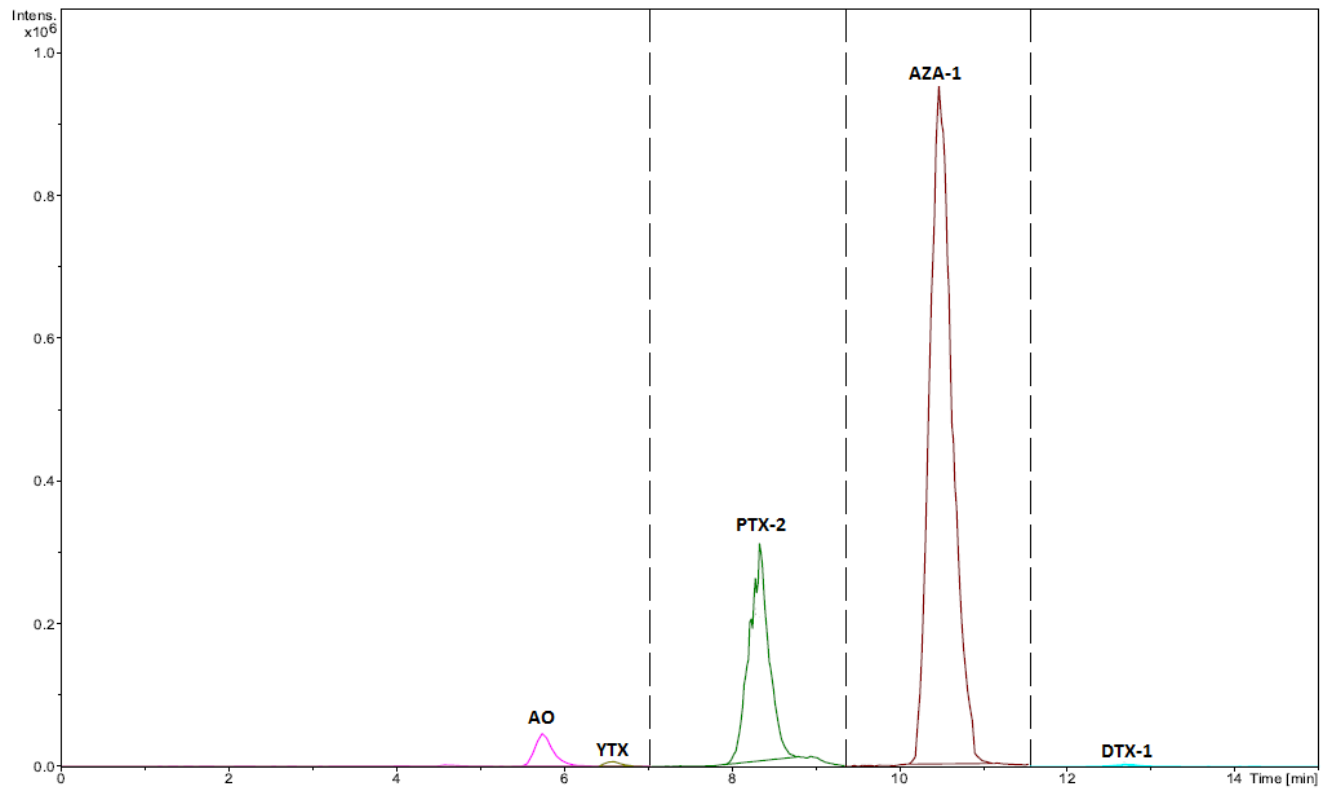
## Toxinas Lipofílicas

Para la detección y cuantificación de las toxinas lipofílicas mediante cromatografía líquida con espectrometría de masa (LC-MS), se utilizó una solución mix de estándares, que consistió en: 20  $\mu\text{L}$  de PTX-2 1,66  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{L}$  de YTX 1,53  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{L}$  de AZA-1 0,8  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{L}$  de OA/DTX1 4.89  $\mu\text{M}$ /0.62  $\mu\text{M}$ . En las figuras 21 y 22 se aprecian los cromatogramas de ión extraído (EIC) de la mezcla de estándares, de esta forma a través de la obtención de fragmentos característicos de estos, se pudo determinar la presencia de cada toxina. Uno de los parámetros empleados para la detección de estas toxinas son los fragmentos característicos como se aprecia en la tabla 13, siendo las transiciones para AO: m/z 803 $\rightarrow$ 255, m/z 803 $\rightarrow$ 563 y m/z 803 $\rightarrow$ 785. YTX fragmentación en: m/z 1141 $\rightarrow$ 1062; PTX-2 fragmentos de: m/z 877 $\rightarrow$ 823; AZA-1 fragmentos de: m/z 843 $\rightarrow$ 806, m/z 843 $\rightarrow$ 825 y DTX-1 con transiciones: m/z 817 $\rightarrow$ 255, m/z 817 $\rightarrow$ 563 y m/z 817 $\rightarrow$ 799 (Gerssen *et al.* 2011). Además, a cada peak cromatográfico de cada toxina identificada se le determinó su espectro de masas característico (figura 23).

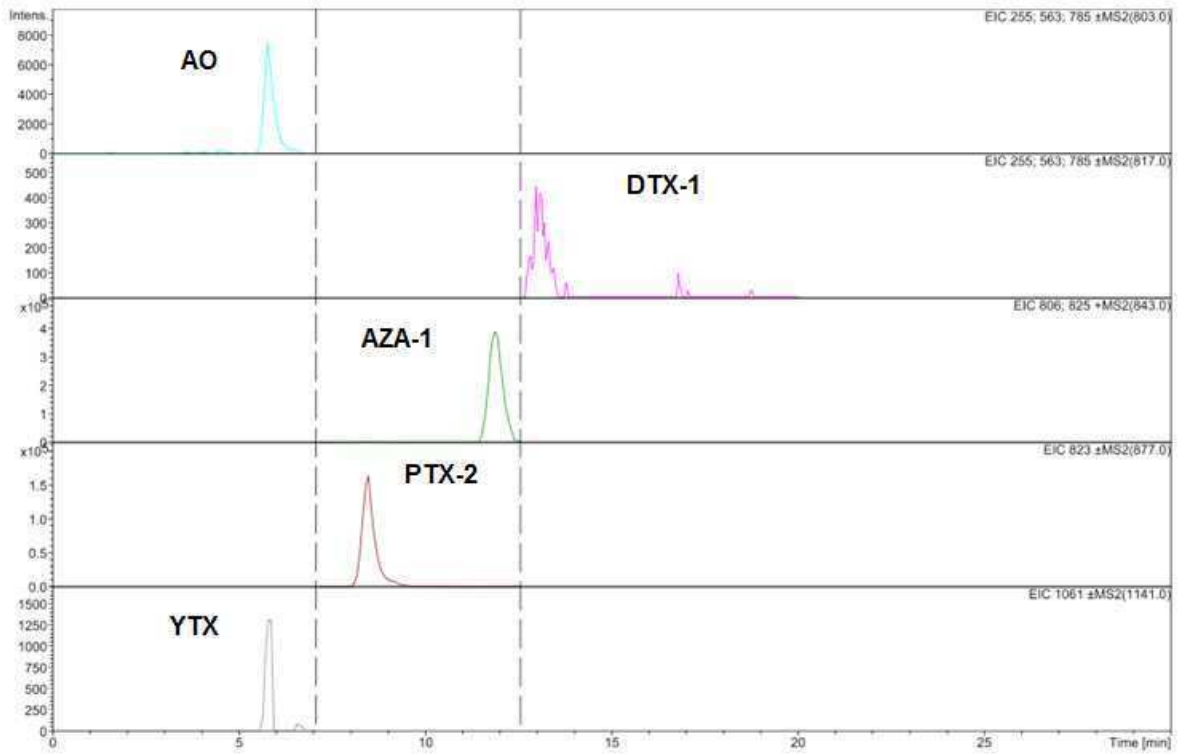
**Tabla 13.** Parámetros para la determinación de Toxinas lipofílicas mediante LC-MS/MS (Fux *et al.* 2011, Gerssen *et al.* 2011).

TOXINA	m/z	IÓN MOLECULAR	FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS
AO	803	[M-H <sup>-</sup> ]	255-563-785-733-763-769
DTX-1	817	[M-H <sup>-</sup> ]	183-255-447-465-563-747-765-783-799
YTX	1147	[M-H <sup>-</sup> ]	599-671-799-855-925-977-1062
PTX-2	877	[M-H <sup>+</sup> ]	213-275-439-551-823
AZA-1	843	[M-H <sup>+</sup> ]	168-262-362-672-806-825

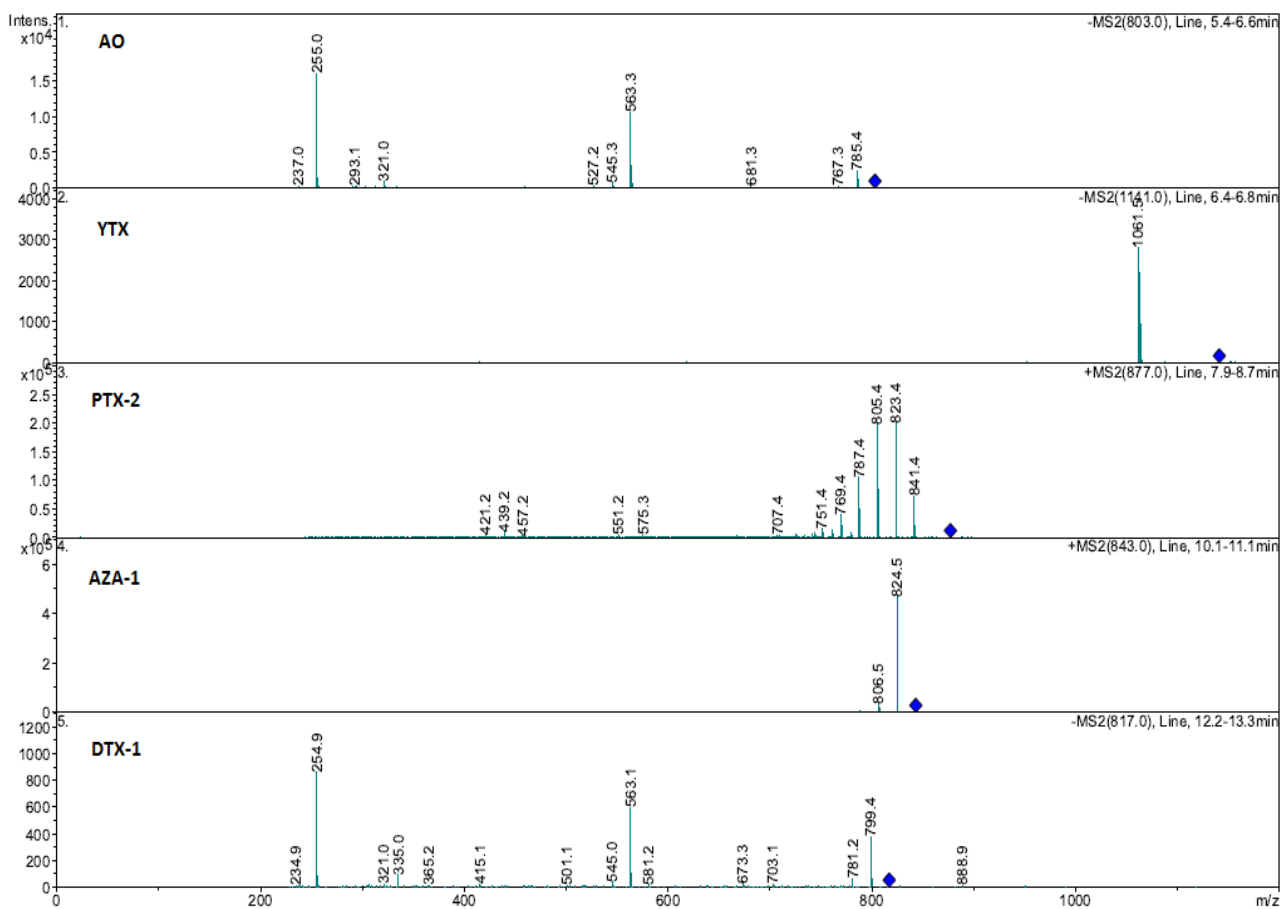
Siguiendo estos parámetros, se evaluaron, analizaron y cuantificaron todas las muestras de invertebrados marinos de Isla Huichas, Puerto Aguirre, Región de Aysén.



**Figura 21.** Cromatograma LC-MS/MS de la solución mix de estándares de toxinas lipofílicas AO, YTX, PTX-2, AZA-1 y DTX-1.



**Figura 22.** Cromatogramas LC-MS/MS de los estándares de toxinas lipofílicas AO, YTX, PTX-2, AZA-1 y DTX-1 por separado.



**Figura 23.** Espectros de masa de la solución mix de estándares de toxinas lipofílicas AO, YTX, PTX-2, AZA-1 y DTX-1.

## Perfil de toxinas lipofílicas en Bivalvos

### *Venus antiqua* (Almeja)

Los resultados obtenidos desde muestras rerecolectadas de *Venus antiqua* (n=21) evidenciaron la presencia de AO, DTX-1, YTX, AZA-1 y PTX-2 a concentraciones variables dependiendo de la zona colectada (tabla 14). AZA-1 fue la toxina que estuvo presente en un mayor número de casos en esta especie, determinándose una concentración de 45,1  $\mu\text{g/Kg}$ , siendo este valor máximo detectado en Isla Atenais, (zona 28; 45.241406s, 73.581214w; figura 8). DTX-1 fue la toxina que presentó altas concentraciones, con valores que promediaron los 217  $\mu\text{g/Kg}$  en Isla Atenais (zona 28). Por otro lado, AO presentó una concentración máxima de 36,2  $\mu\text{g/Kg}$  (zona 28; 45.241406s, 73.581214w) y PTX-2 una concentración de 56,7  $\mu\text{g/Kg}$  en la zona 1 (Isla Vergara; 45.198162s, 73.537395w; figura 8).

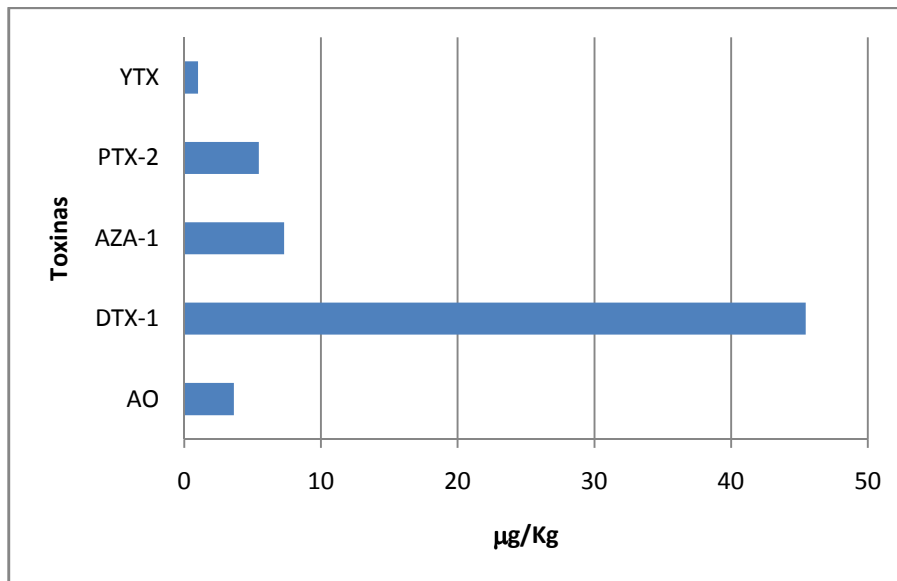
YTX presentó una concentración máxima de 12  $\mu\text{g YTX/Kg}$  en la zona 29 (Isla Atenais) y se detectó además en la zona 9 (Isla Herraduras) a concentraciones de 8,95  $\mu\text{g YTX/Kg}$ , valores que no superan el establecido como límite internacionalmente establecido de 1 mg YTX/Kg.

Por otro lado, en las zonas 4 (Isla Viel), zona 27 (Isla Merinea) y zona 28 (Isla Atenais) las concentraciones superaron la norma de 160  $\mu\text{g AO eq/Kg}$  a concentraciones de 185,7  $\mu\text{g AO eq/Kg}$ , 210,2  $\mu\text{g AO eq/Kg}$  y de 298,6  $\mu\text{g AO eq/Kg}$  respectivamente.

**Tabla 14.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Venus antiqua* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (figura 8).n.d. = no detectada. Valores expresados en µg/Kg.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas (µg/Kg)				
				OA	DTX-1	YTX	AZA	PTX-2
1	Isla Vergara	45.198162s	73.537395w	n.d.	n.d.	n.d.	5,45	56,7
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	n.d.	n.d.	n.d.	11,9	47,4
3	Isla Viel	45.201836s	73.592.660	9,31	89,2	n.d.	n.d.	n.d.
4	Isla Viel	45.192896s	73.586825w	17,8	167,6	n.d.	n.d.	n.d.
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d.	n.d.	n.d.	6,21	n.d.
8	Islas Herraduras	45.181588s	73.476987w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d.	n.d.	8,95	2,38	n.d.
11	Islas Herraduras	45.181452s	73.460608w	8,92	77,2	n.d.	7,45	9,62
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d.	n.d.	n.d.	5,68	n.d.
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	n.d.	n.d.	n.d.	8,92	n.d.
20	Punta Olea	45.043770s	73.467782w	n.d.	n.d.	n.d.	13,7	n.d.
21	Isla Ñancul	45.038287s	73.437435w	n.d.	n.d.	n.d.	4,62	n.d.
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,06
24	Isla Hilda	45.079594s	73.446156w	n.d.	n.d.	n.d.	3,86	n.d.
26	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27	Isla Merinea	45.249272s	73.604551w	n.d.	186,7	n.d.	23,5	n.d.
28	Isla Atenais	45.241406s	73.581214w	36,2	217,3	n.d.	45,1	n.d.
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d.	n.d.	12,0	n.d.	n.d.
31	Isla Pilcomayo	45.228222s	73.533564w	4,05	101,6	n.d.	n.d.	n.d.
32	Isla Pilcomayo	45.234422s	73.525405w	n.d.	115,1	n.d.	8,03	n.d.
35	Isla Vergara	45.178624s	73.521049w	n.d.	n.d.	n.d.	6,59	n.d.

En la figura 24 se observa el perfil promedio de *V. antiqua* correspondiente al sector total de Islas Huichas, donde se aprecia la dominancia de DTX-1 cuya concentración promedio fue de 45 µg/Kg. Las otras toxinas mostraron valores de 4,0 µg/Kg (AO), 7,0 µg/Kg (AZA-1) y de 5,0 µg/Kg (PTX-2), mientras la concentración de YTX fue de 1,0 µg YTX/Kg.



**Figura 24.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Venus antiqua*, en el sector de Isla Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 56 µg AO eq/Kg y 1,0 µg YTX/Kg.

### ***Aulacomya ater* (Cholga)**

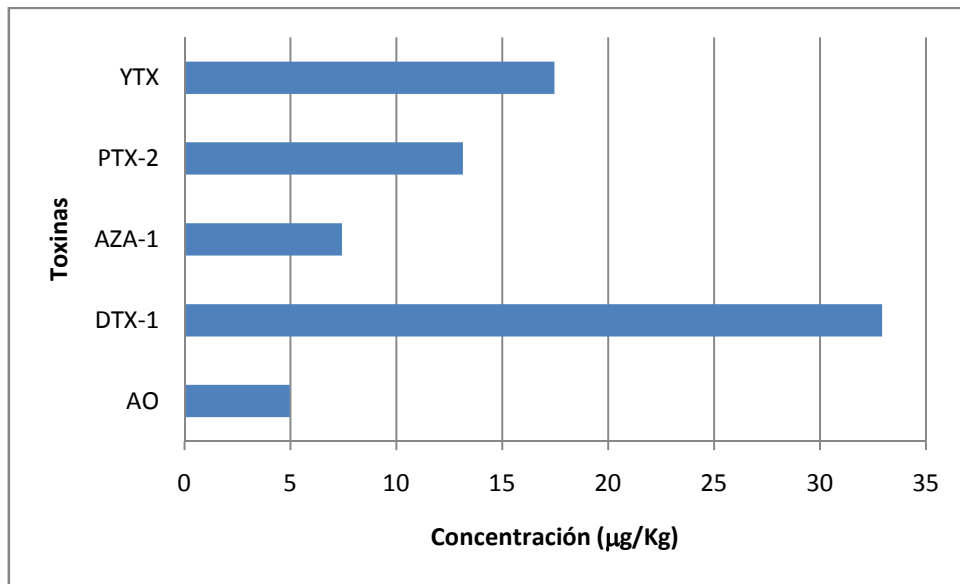
Los resultados obtenidos de los análisis de toxinas lipofílicas realizados a la especie *A. ater* se pueden apreciar en detalle en la tabla 15. En ella, se aprecia una alta presencia y dominio de YTX en 14 de las 16 muestras (87,5 %), seguido por AZA-1 (62,5%), PTX-2 (56,3%), AO (25%) y DTX-1 (18,8 %). De estas, DTX-1 fue la toxina que presentó las mayores concentraciones detectadas con 287,2 µg/Kg en Puerto Rosita, zona 33 (45.233380s, 73.497803w), aunque su presencia no fue relevante en la mayoría de los puntos evaluados en las zonas de monitoreo. Su presencia además, siempre estuvo asociada en forma simultánea a la identificación de AO (23,7 µg/Kg; N=3), aún cuando la presencia de YTX (18,1 µg/Kg) y AZA (21,8 µg/Kg), se detectaron con una mayor incidencia, no fueron dentro de un perfil complejo en el promedio de muestras evaluadas.

En la zona 33 (Puerto Rosita) se determinó la máxima toxicidad, con un valor de 332,7 µg AO eq/Kg, además de la zona 2 (191,8 µg AO eq/Kg) y 14 (177 µg AO eq/Kg). La toxina YTX alcanzó rangos de toxicidad entre los 3,4 µg YTX/Kg y 35,2 µg YTX/Kg (tabla 16).

**Tabla 15.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Aulacomya ater*, recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )				
				OA	DTX-1	YTX	AZA	PTX-2
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	7,2	114,8	n.d.	23,6	46,2
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d.	n.d.	8,93	21,3	n.d.
8	Islas Herraduras	45.181588s	73.476987w	n.d.	n.d.	15,7	n.d.	34,8
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d.	n.d.	23,9	n.d.	12,3
12	Islas Herraduras	45.174903s	73.446989w	n.d.	n.d.	34,7	7,71	18,6
13	Punta Riel	45.194944s	73.396193w	n.d.	n.d.	19,5	n.d.	n.d.
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	21,8	124,9	35,2	8,93	21,4
15	Punta Riel	45.195302s	73.343199w	n.d.	n.d.	33,2	9,52	20,3
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d.	n.d.	3,37	7,04	n.d.
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	21,9	n.d.	9,32	7,64	n.d.
18	Isla Julian	45.109127s	73.513445w	n.d.	n.d.	18,3	8,96	13,8
20	Punta Olea	45.043770s	73.467782w	n.d.	n.d.	23,8	n.d.	15,8
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d.	n.d.	26,9	n.d.	n.d.
33	Puerto Rosita	45.233380s	73.497803w	23,7	287,2	18,1	21,8	n.d.
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	n.d.	n.d.	8,55	6,04	27,1

En la figura 25 se observa el perfil promedio de la especie en la zona de estudio. DTX-1 correspondió a la toxina de mayor concentración ( $33 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ), seguida por YTX ( $17 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ), PTX-2 ( $13 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ), AZA-1 ( $7,0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ) y AO ( $5,0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ).



**Figura 25.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Aulacomya ater*, en el sector de Isla Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 76 µg AO eq/Kg y 18 µg YTX/Kg.

### ***Mytilus edulis chilensis* (Chorito)**

Del total de zonas evaluadas en el sector de Islas Huichas, en sólo 4 de ellas se obtuvo este recurso, pero sólo dos evidenciaron la presencia de toxinas lipofílicas por HPLC-MS/MS (tabla 16). De estas, Isla Luchín (zona 23) presentó simultáneamente YTX a una concentración de 12,7 µg YTX/Kg, y de AZA-1 y PTX-2 con una concentración de 31,1 µg AO eq/Kg. Por otro lado, la zona 25 correspondiente a la Isla Chaculay, zona distante en aproximadamente de 50 kms de Isla Luchín, se detectó la presencia sólo de AZA-1 a una concentración de 44,2 µg/Kg.

**Tabla 16.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Mytilus edulis chilensis* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	µg/Kg				
				AO	DTX-1	YTX	AZA	PTX-2
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	n.d.	n.d.	12,7	9,3	21,8
25	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d.	n.d.	n.d.	44,2	n.d.

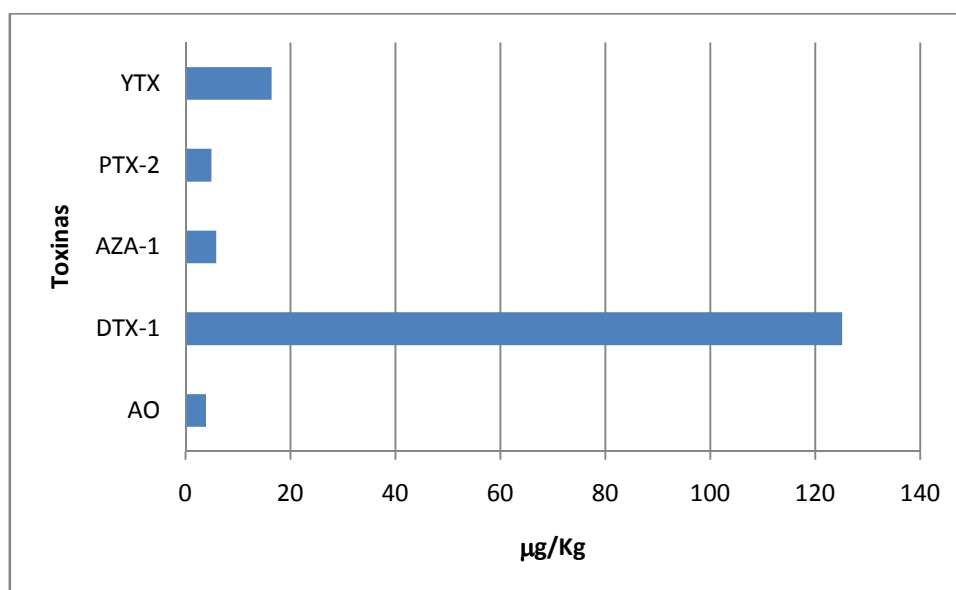
### ***Choromytilus chorus* (Choro Zapato)**

Las zonas que reflejaron presencia de toxinas en esta especie correspondieron a 6 en total. De estas, las más altas concentraciones fueron aplicables a DTX-1, alcanzando un valor máximo de 345,7 µg/Kg (Isla Atenais; figura 8). Su presencia en algunos casos estuvo ligado a la toxina AO, aún cuando también destacó por estar sola y predominar significativamente el perfil tóxico total de toxinas lipofílicas (Islote los amigos y Punta Riel respectivamente) (tabla 17). No menor fue la abundancia detectada para YTX, la que se detectó en un 57,1% de los casos, seguida por AZA-1 y PTX-2 en el total de casos. Un perfil complejo y destacado del total de casos evaluados, correspondió a Punta Riel (zona 14) en que destacó por presentar todas las toxinas lipofílicas conocidas en concentraciones variables, predominada evidentemente por DTX-1.

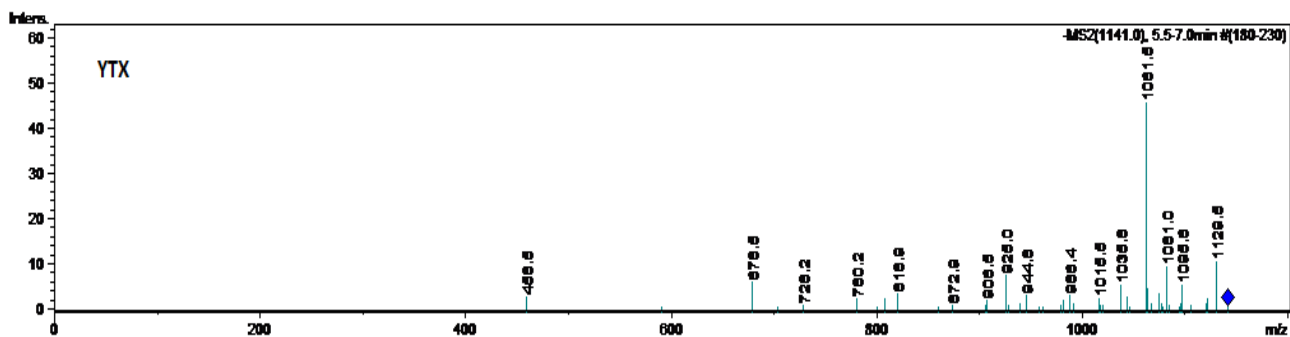
**Tabla 17.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Choromytilus chorus* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas (µg/Kg)				
				AO	DTX-1	YTX	AZA	PTX-2
7	Islas Herraduras	45.175410s	73.477686w	n.d.	n.d.	24,7	n.d.	n.d.
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d.	n.d.	46,7	23,9	n.d.
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	17,8	111,9	8,92	13,4	34,6
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	9,31	221,9	n.d.	3,51	n.d.
29 a	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d.	345,7	34,7	n.d.	n.d.
29 b	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d.	196,3	n.d.	n.d.	n.d.
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

La figura 26 muestra el perfil tóxico promedio de la especie *Choromytilus chorus* colectados en el sector de análisis (Islas Huichas). De entre todas las toxinas estudiadas, DTX-1 fue la que presentó la mayor concentración promedio en la zona, con un valor de 125,1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  lo que corresponde al 80% de la toxicidad total (156  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg). Las otras toxinas presentaron bajas concentraciones, siendo estas de 3,9  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AO), 5,83  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (AZA-1), 4,94  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (PTX-2) y de 16,4  $\mu\text{g}$  YTX/Kg de Yessotoxina. A su vez la figura 27 se aprecia el espectro de masa característico y que determina la presencia indudable de la YTX en la especie *Choromytilus chorus*.



**Figura 26.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Choromytilus chorus*, en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 156,1  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg y 16,4  $\mu\text{g}$  YTX/Kg.



**Figura 27.** Espectro de masa de YTX de la muestra de *Choromytilus chorus* colectada desde Isla Herraduras, zona 7.

### ***Gari solida* (Culengue)**

Los resultados de los análisis de toxinas lipofílicas realizados a *G. solida* evidenciaron perfiles complejos de toxinas desde algunas de las zonas evaluadas (tabla 18), identificándose las siguientes toxinas: AO, DTX-1, PTX-2, YTX y AZA-1. AO se detectó en un 40 % de las muestras de Culengue, siendo el valor máximo detectado de 29,2 µg/Kg en Isla Costa y un valor mínimo de 1,03 µg/Kg en Isla Pilcomayo (zona 32). DTX-1 al igual que AO se detectó en el 40% de las muestras y fue la toxina que presentó concentraciones superiores, promediando valores de 213,6 µg/Kg, su detección en la mayoría de las muestras estuvo asociada a la presencia de AO situación que se determinó en Isla Herraduras, zona 9 (45.184425s, 73472231w), Isla Merinea, zona 27 (45.249272s, 73.604551), Isla Atenais, zona 28 y 29 (45.237966s, 73.577138w) y Punta Quintana, zona 34 (45.199729s, 73.513791w).

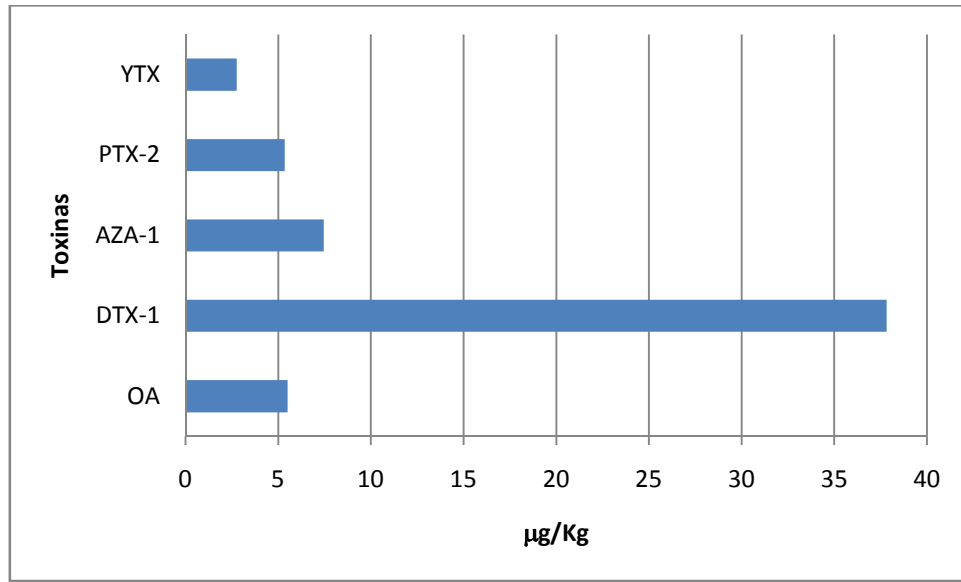
PTX-2 se identificó solo en Islote los Amigos (zona 16), Isla Atenais (zona 29) y Punta Quintana (zona 34), obteniendo una concentración máxima de 67,9 µg/Kg (zona 29). Por su parte, AZA-1 correspondió a la toxina que se detectó con mayor frecuencia (60%) con respecto a sus congéneres lipofílicos, detectándose con valores entre 1,02 µg/Kg (Isla Ñacul 45.038287, 73.437435w) y 42,7 µg/Kg (Isla Atenais 45.241406s, 73.581214w). A su vez, Yessotoxina (YTX) sólo se identificó en el 25% del total de muestras evaluadas con un valor máximo de 18,7 µg YTX/Kg.

Destaca de entre las muestras el perfil identificado en Punta Quintana (zona 34), lugar donde se identificó simultáneamente la presencia de AO (3,01 µg/Kg), DTX-1 (44,8 µg/Kg), AZA-1 (11,6 µg/Kg) y PTX-2 (21,8 µg/Kg) con una toxicidad total de 81,2 µg AO eq/Kg y de 5,02 µg YTX/Kg.

**Tabla 18.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Gari solida* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas (µg/Kg)				
				OA	DTX-1	YTX	AZA	PTX-2
4	Isla Viel	45.192896s	73.586825w	21,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d.	n.d.	11,2	n.d.	n.d.
7	Islas Herraduras	45.175410s	73.477686w	n.d.	n.d.	n.d.	9,46	n.d.
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	2,65	76,1	n.d.	5,83	n.d.
10	Islas Herraduras	45.184425s	73.464562w	n.d.	n.d.	n.d.	4,87	n.d.
11	Islas Herraduras	45.181452s	73.460608w	n.d.	n.d.	n.d.	3,68	n.d.
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d.	67,3	n.d.	6,93	17,3
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	n.d.	n.d.	3,97	n.d.	n.d.
19	Isla Julian	45.103844s	73.510936w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	Punta Olea	45.043770s	73.467782w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	Isla Ñancul	45.038287s	73.437435w	n.d.	n.d.	18,7	1,02	n.d.
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	n.d.	n.d.	16,3	n.d.	n.d.
26	Isla Chaculay	45.242198s	73.547886w	n.d.	n.d.	n.d.	18,3	n.d.
27	Isla Merinea	45.249272s	73.604551w	15,3	213,6	n.d.	n.d.	n.d.
28	Isla Atenais	45.241406s	73.581214w	26,7	163,8	n.d.	42,7	n.d.
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	10,7	108,7	n.d.	33,1	67,9
30	Isla Costa	45.241370s	73.567984w	29,2	n.d.	n.d.	9,16	n.d.
31	Isla Pilcomayo	45.228222s	73.533564w	n.d.	55,1	n.d.	n.d.	n.d.
32	Isla Pilcomayo	45.234422s	73.525405w	1,03	27,2	n.d.	2,37	n.d.
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	3,01	44,8	5,02	11,6	21,8

El perfil de las toxicidades promedios detectados en la especie *G. solida* se aprecia en la figura 28. Este perfil destaca por el predominio de DTX-1, siendo parte importante de la toxicidad total promedio de 37,8  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .



**Figura 28.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Gari solida*, en el sector de Isla Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 58,9  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg y 2,8  $\mu\text{g}$  YTX/Kg.

### ***Tagelus dombeii* (Navajuela)**

Este recurso, correspondió al más escaso del total de los evaluados, obteniéndose una cantidad representativa de muestra sólo en Isla Luchín (zona 22). En esta especie de bivalvo (*Tagelus dombeii*), sólo se detectó e identificó la presencia de YTX a una concentración de 9,61 µg YTX/Kg, no detectándose las otras 4 toxinas (PTX, AO, DTX-1 y AZA-1) en los espectros de masa evaluados (tabla 19).

**Tabla 19.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Tagelus dombeii* colectada en Isla Luchín, sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas (µg/Kg)				
				OA	DTX-1	YTX	AZA	PTX-2
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	n.d.	n.d.	9,61	n.d.	n.d.

## Perfil de toxinas lipofílicas en Gasterópodos

### *Concholepas concholepas* (Loco)

Los análisis realizados al gasterópodo *Concholepas concholepas* evidencian al igual que en algunos bivalvos la presencia de un perfil complejo en algunos casos de toxinas lipofílicas. Dentro de los estudios no se detectaron toxicidades por sobre la norma, siendo los valores más altos registrados de 113,5  $\mu\text{g}$  AO eq/Kg (Punta Riel, zona 14) y de 91,4  $\mu\text{g}$  YTX/Kg (Isla Luchín, zona 22). Sin embargo, a diferencia de los bivalvos, su toxicidad estuvo predominada por la presencia de YTX y AZA-1, aún cuando sus toxicidades individuales no eran relevantes, su marcada presencia en los diferentes puntos destaca por sobre el resto (tabla 20). Ácido Okadaico (AO) fue detectado en algunas zonas como Isla Viel, zonas 2; Punta Riel, zona 14 e Isla Atenais, zona 29 a bajas concentraciones, siendo su identificación asociada en los casos detectados a DTX-1 con concentraciones de 89,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 67,3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (Punta Riel e Isla Atenais).

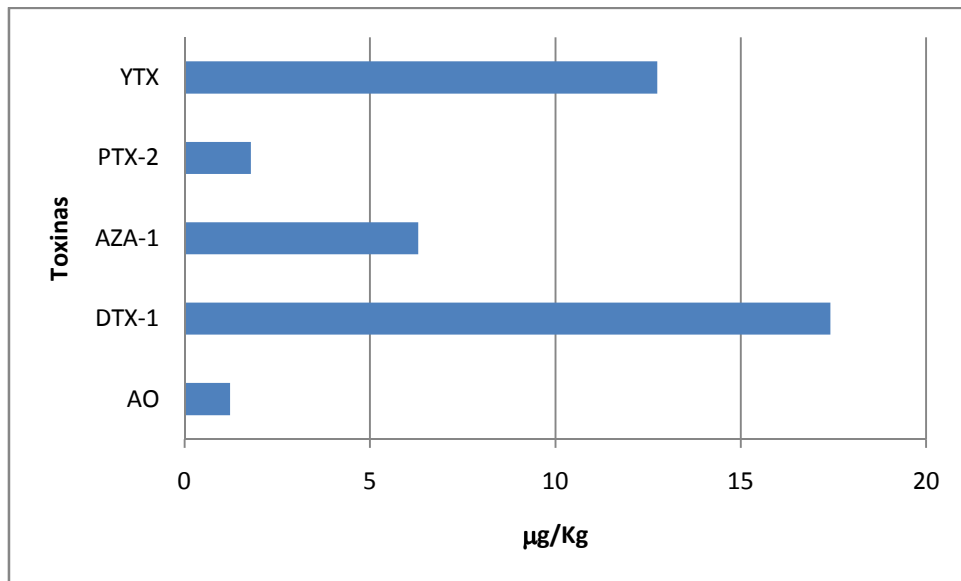
Por otro lado, YTX se detectó solo en un 44,4% de las muestras, alcanzando valores que fluctuaron entre 1,67 y 91,4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , mientras que la PTX-2 registró valores máximos de 11,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (Punta Riel, zona 14).

En esta especie destacó la presencia de AZA-1 siendo la toxina que se detectó en un mayor número de casos, sin embargo, los valores registrados no superan los 31,7  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Isla Atenais (zona 29) fue la única que presentó las 5 toxinas analizadas, siendo DTX-1 la de mayor concentración (67,3 µg/Kg) situación que también se ve reflejada en la figura 29, donde se muestra el perfil promedio de la especie. Los cromatogramas obtenidos mediante LC-MS/MS revelan la presencia de éstas toxinas, reflejado en su patrón de fragmentación característico en el espectro de masa de AO y DTX-1 como se aprecia en las figuras 30 y 31.

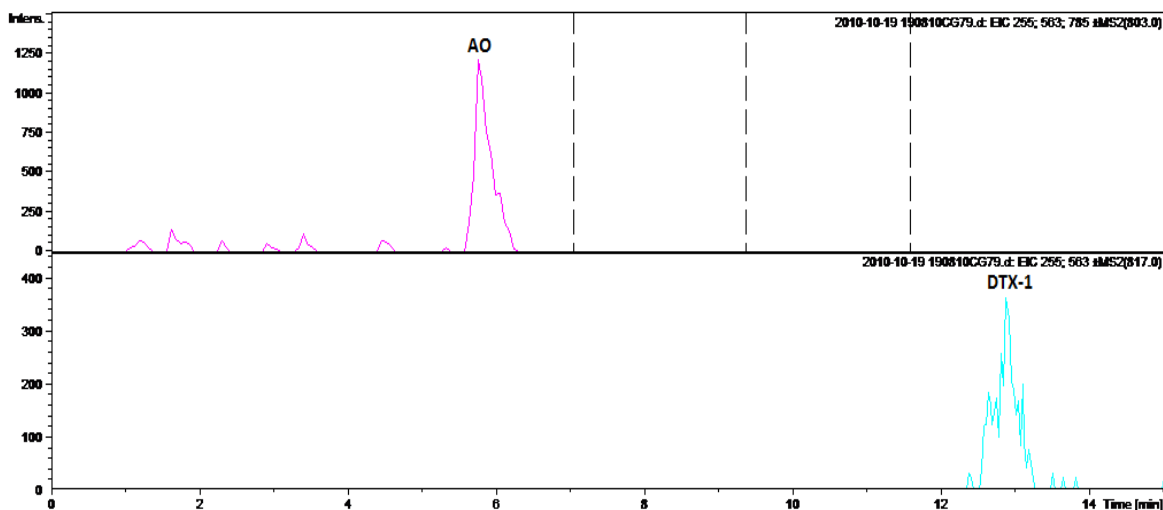
**Tabla 20.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Concholepas concholepas* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en µg/Kg.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas (µg/Kg)				
				AO	DTX-1	YTX	AZA-1	PTX-2
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	2,3	n.d.	n.d.	6,71	n.d.
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d.	n.d.	1,67	2,45	n.d.
7	Islas Herraduras	45.175410s	73.477686w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,56
13	Punta Riel	45.194944s	73.396193w	n.d.	n.d.	8,95	3,21	n.d.
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	6,74	89,5	12,7	5,76	11,5
18	Isla Julian	45.109127s	73.513445w	n.d.	n.d.	n.d.	1,84	n.d.
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	n.d.	n.d.	91,4	31,7	n.d.
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	2,01	67,3	n.d.	5,01	n.d.

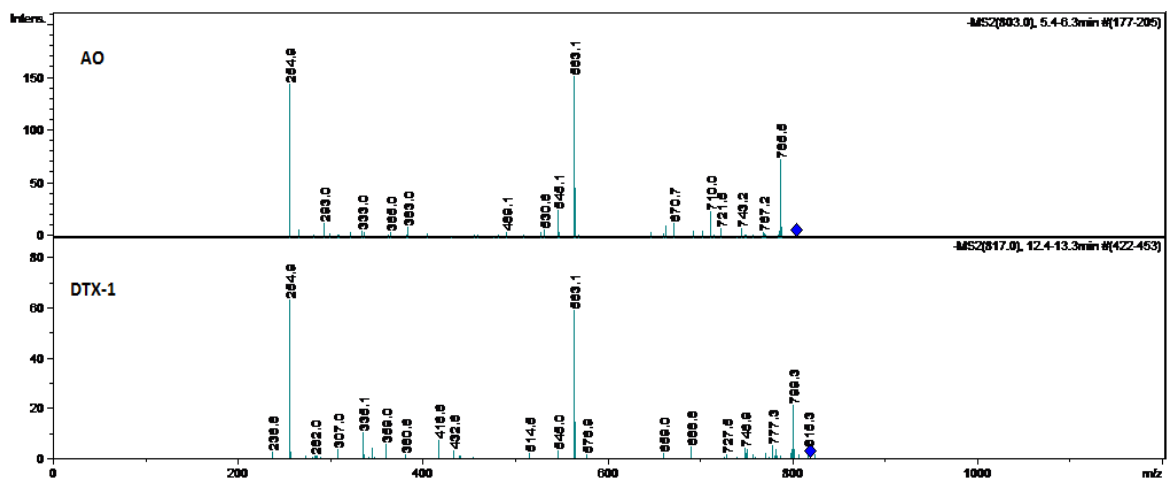


**Figura 29.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas detectadas en *Concholepas concholepas* recolectadas en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén.

Toxicidad total de 39,5 µg AO eq/Kg, 12,8 µg YTX/Kg



**Figura 30.** Cromatograma de LC-MS/MS obtenida desde *Concholepas concholepas* recolectadas en Isla Atenais (zona 29).



**Figura 31.** Espectro de masa de AO y DTX-1 obtenidos desde la muestra de *Concholepas concholepas* correspondiente a Isla Atenais (zona 29).

### ***Argobuccinum ranelliformes* (Caracol del sur)**

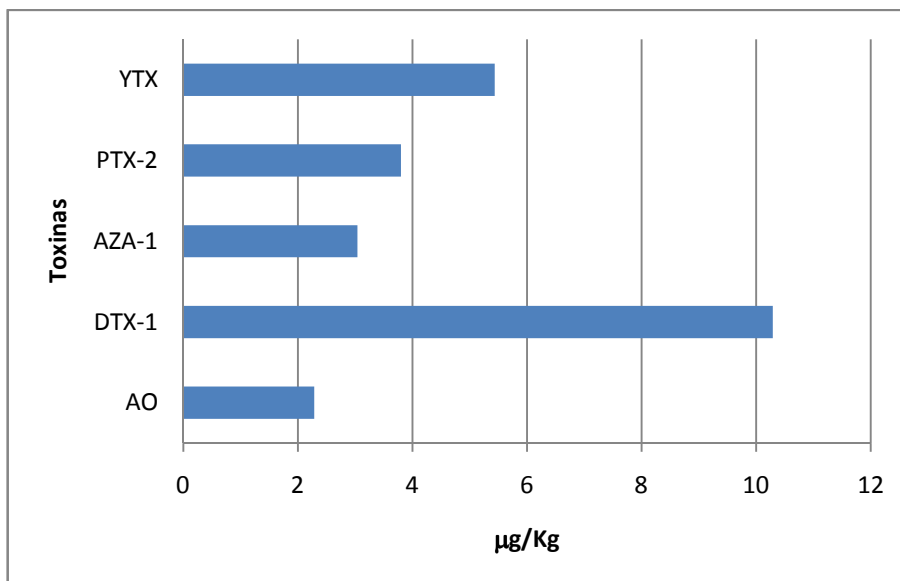
Los resultados obtenidos tras los análisis realizados al gasterópodo *A. ranelliformes* determinó la identificación y cuantificación de las 5 toxinas estudiadas, siendo sus concentraciones más altas detectadas en las diferentes zonas de estudios de 15,6 µg/Kg (AO), 78,3 µg/Kg (DTX-1), 11,8 µg/Kg (YTX), 9,18 µg/Kg (AZA-1) y 18,1 µg/Kg (PTX-2) (tabla 21). En ninguno de los casos se superó la norma europea establecida (160 µg AO eq/Kg), correspondiendo el máximo valor detectado a 93,9 µg AO eq/Kg en Islote Garza, zona 6 (45.227354, 73.617837w).

YTX se detectó y cuantificó en 7 de los 11 sectores de monitoreo, detectándose valores de hasta 32,1 µg YTX/Kg en el sector de Isla Luchin, (zona 23) y su valor más bajo fue de 2,2 µg YTX/Kg.

**Tabla 21.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Argobuccinum ranelliformes* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d. = no detectada). Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ .

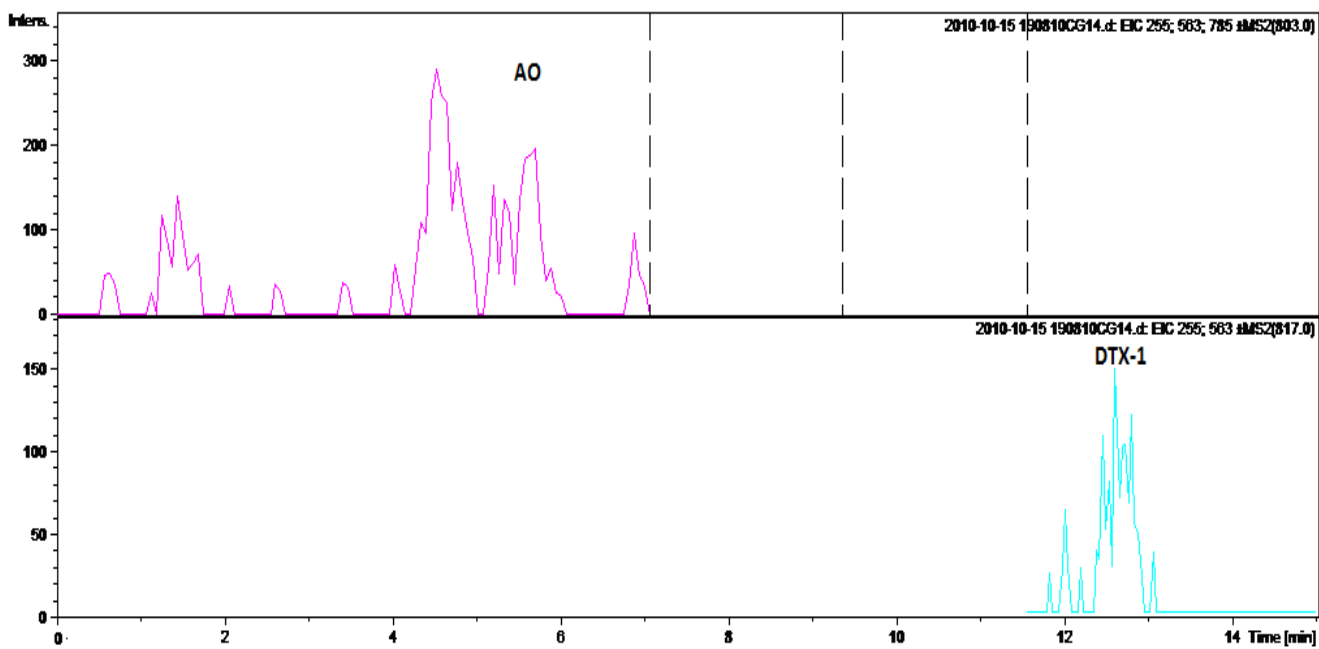
Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g/Kg}$ )				
				OA	DTX-1	YTX	AZA-1	PTX-2
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	n.d.	n.d.	n.d.	4,67	11,9
3	Isla Viel	45.201836s	73.592.660	n.d.	n.d.	6,56	9,18	n.d.
5	Islote La Garza	45.227354s	73.617837w	15,6	78,3	n.d.	n.d.	n.d.
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	n.d.	n.d.	n.d.	5,53	18,1
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	n.d.	n.d.	11,8	1,84	n.d.
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	9,55	n.d.	2,19	n.d.	n.d.
16	Islote Los Amigos	45.124865s	73.497396w	n.d.	11,4	1,09	3,85	n.d.
17	Isla Julian	45.114503s	73.502580w	n.d.	23,5	3,86	n.d.	n.d.
18	Isla Julian	45.109127s	73.513445w	n.d.	n.d.	2,21	1,03	n.d.
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	n.d.	n.d.	32,1	7,32	11,8
34	Punta Quintana	45.199729s	73.513791w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

El perfil tóxico promedio de la especie en el sector de análisis de Islas Huichas (figura 32) muestra estar dominado por la toxina DTX-1 cuya concentración promedio fue de  $10 \mu\text{g/Kg}$ , mientras que la segunda toxina de mayor concentración fue YTX ( $5 \mu\text{g/Kg}$ ). Las otras toxinas mostraron concentraciones promedios de  $2,0 \mu\text{g/Kg}$  (AO),  $3,0 \mu\text{g/Kg}$  (AZA-1) y de  $4,0 \mu\text{g/Kg}$  de PTX-2.

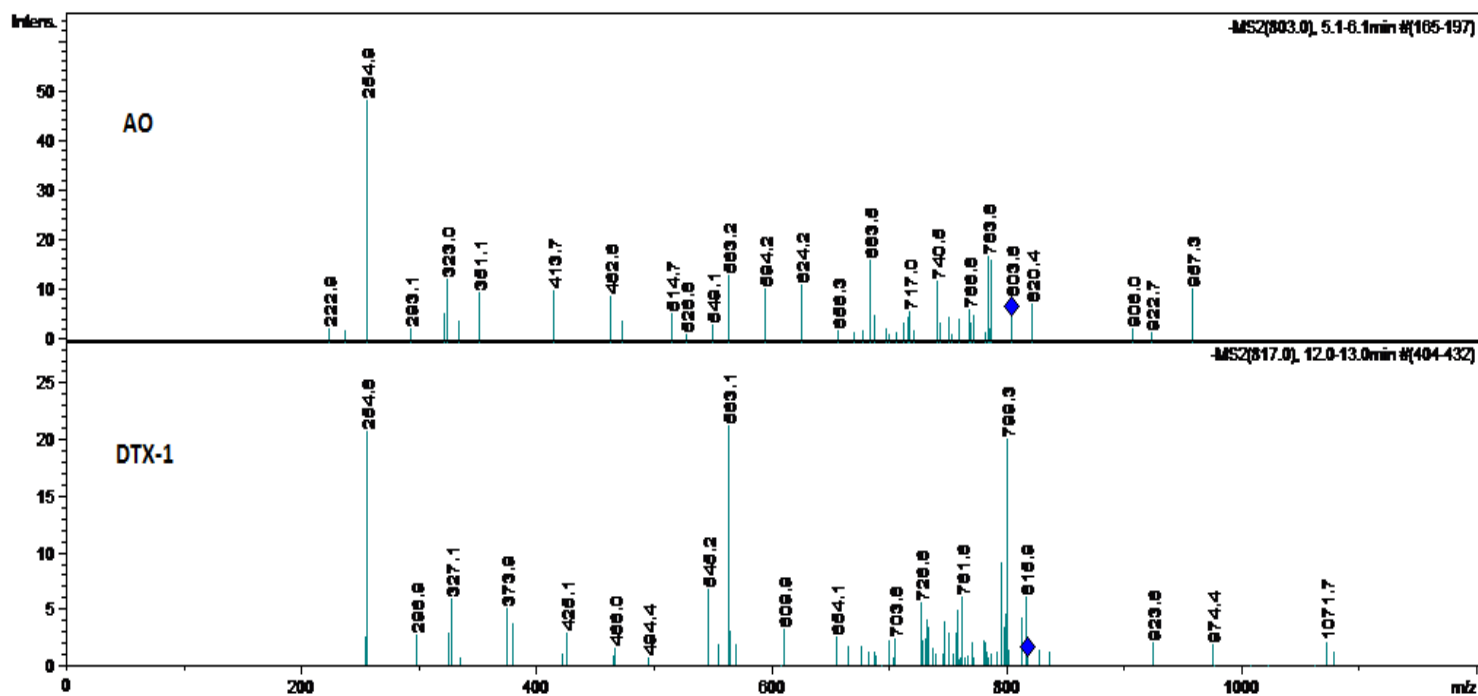


**Figura 32.** Perfil promedio de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Argobuccinum ranelliforme*, en el sector de Isla Huichas, Región de Aysén. Toxicidad total de 25 µg AO eq/Kg y 5,0 µg YTX/Kg.

Los datos antes expuestos, son resultado de las evaluaciones realizadas a cada matriz, a través, de HPLC-MS. La figura 33 muestra el cromatograma de masa obtenido desde las muestras recolectadas en Islote la Garza (zona 5) en estos se aprecia los picos cromatográficos de AO y DTX-1, coincidentes con los tiempos de retención de los estándares analíticos utilizados. De esta forma, el espectro de masas obtenido de dichas muestras, refleja un perfil de fragmentos característicos para cada toxina identificada (figura 34).



**Figura 33.** Cromatogramas de LC-MS/MS de la muestra de *A. ranelliformes* provenientes del Islote la Garza sector de Islas Huichas.



**Figura 34.** Espectros de masas de AO y DTX-1 obtenidos desde *A. ranelliformes* colectado en Islote Garza, sector de Islas Huichas, Región de Aysén.

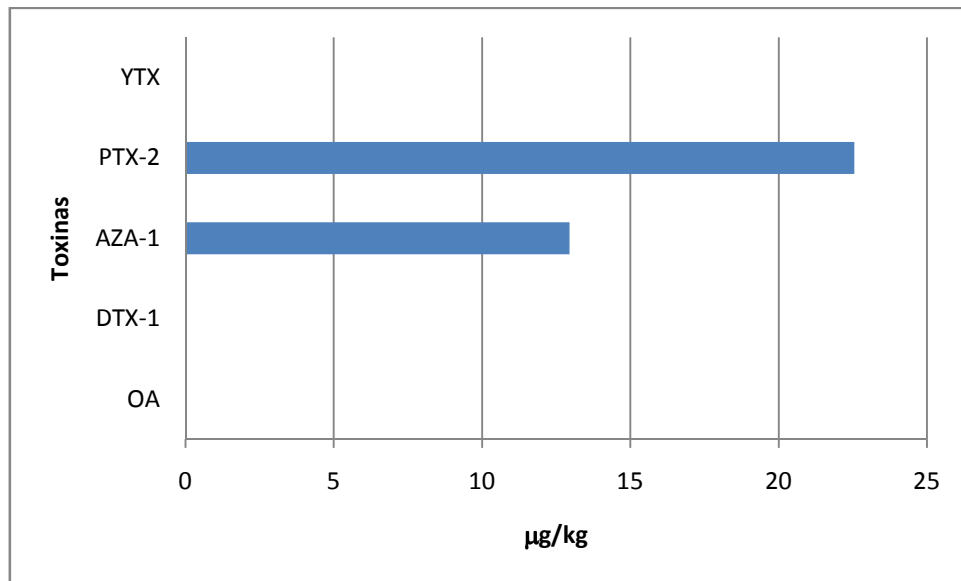
## Perfil de toxinas lipofílicas en crustáceos

### *Austromegabalanus psittacus* (Picoroco)

Los análisis realizados a las dos muestras de *A. psittacus* detectaron la presencia de AZA-1 y PTX-2 sólo en la zona 1 (tabla 22), a concentraciones de 45,1 y 25,9  $\mu\text{g/Kg}$  (Isla Vergara; 45.198162s, 73.537395w) alcanzando una toxicidad total de 71  $\mu\text{g AO eq/Kg}$ , valor que no supera la norma establecida internacionalmente de 160  $\mu\text{g AO eq/Kg}$ , (figura 35). En la Isla Atenais, zona 29 no se detectó ni identificó ninguna de las toxinas lipofílicas analizadas.

**Tabla 22.** Perfil de toxinas lipofílicas en *Austromegabalanus psittacus* recolectadas en las diferentes zonas de muestreo en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén (n.d = no detectada). Valores expresados en  $\mu\text{g/Kg}$ .

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Toxinas ( $\mu\text{g/Kg}$ )				
				OA	DTX-1	YTX	AZA-1	PTX-2
1	Isla Vergara	45.198162s	73.537395w	n.d.	n.d.	n.d.	25,9	45,1
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



**Figura 35.** Perfil de toxinas lipofílicas identificadas y cuantificadas en *Austromegabalanus psittacus*, en el sector de Isla Vergara. Toxicidad total de 71 µg AO eq/Kg.

## DISCUSIÓN

Las Floraciones Algales Nocivas (FAN) es un fenómeno natural que ha adquirido gran importancia en los últimos años a nivel mundial dado el aumento en su frecuencia, extensión y por el potencial daño que puede provocar a la economía y a la salud humana. El carácter endémico que poseen las toxinas del VDM y VPM en los canales y fiordos del sur de Chile, se ve notablemente potenciado con recientes hallazgos de nuevas toxinas tales como Azaspirácidos (AZAs) y Pectenotoxinas (PTX).

La presencia de toxinas paralizantes (STX y sus análogos) y toxinas lipofílicas (AO, DTX-1, AZA-1, YTX, PTX-2) en las muestras de invertebrados marinos (Cholgas, Choritos, Choro zapato, Caracol del sur, Loco, Almeja, Culengues, Navajuelas y Picorocos) estudiados en el sector Islas Huichas, Región de Aysén, demuestran la importancia de los estudios toxicológicos realizados a estas especies por ser recursos de explotación comercial.

### **Toxinas Paralizantes**

Los resultados obtenidos de los análisis de toxinas paralizantes a las 91 muestras de invertebrados marinos colectados en un total de 35 estaciones, determinaron que el 82,4% de estas sobrepasaron el límite regulatorio de 80  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g de carne de molusco. Las altas toxicidades determinadas en los análisis, mostró altos niveles tóxicos en los organismos filtradores *Gari solida*, *Venus antiqua*, *Mytilus edulis chilensis*, *Choromytilus chorus*. Esto básicamente

ocurre debido a su mecánica de alimentación, ya que acumulan de manera más rápida las toxinas producidas por el fitoplancton nocivo (García *et al* 2004, Valreztis & Undelan 2008, Bauder *et al* 2001, Torgersen *et al* 2008), en el caso particular de toxinas paralizantes, el dinoflagelado *Alexandrium catenella*. Por otro lado, los gasterópodos carnívoros *Concholepas concholepas* y *Argobuccinum ranelliformes* también presentaron altas toxicidades (1.079 y 4.955 µg STX eq/100 g, respectivamente) debido a que se alimentan de moluscos bivalvos como Choritos y Almejas los que acumulan estas toxinas.

El perfil de toxinas encontrado en las especies analizadas coincide con los encontrados en *A. catenella* por Lagos (1998), Compagnon *et al.* (1998) y Krock *et al.* (2007) compuesto por los isómeros C1/C2, C3/C4, GTX-4/GTX-1, GTX-5, GTX-3/GTX-2, neoSTX, dcSTX y STX.

En las muestras de *Mytilus edulis chilensis*, se detectó toxicidades muy por sobre la norma legislativa, alcanzando valores promedios de 4.202 µg STX eq/100 g, datos obtenidos desde Isla Luchín (45.075572s, 73.432999w). Sin embargo, estos valores en ningún caso llegan a ser referenciales, pues la estacionalidad y variabilidad año a año así lo demuestran. Así por ejemplo, en la zona se ha detectado por presentar niveles de 107.129 µg STX eq/100 g, en la misma especie (Molinet *et al.* 2003).

Por otro lado, los resultados obtenidos en los gasterópodos *Concholepas concholepas* y *Argobuccinum ranelliforme* son similares a los obtenidos por los de Compagnon *et al.* (1998) en donde las máximas toxicidades encontradas en glándulas digestivas de ambos moluscos fue de 1.079  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g y 4.955  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g respectivamente. Los perfiles de toxinas se asemejan al de sus presas naturales (cholgas, Choritos), sin embargo, la concentración de las toxinas varía, siendo la STX la que domina en los perfiles, patrón que también ha sido encontrado en gasterópodos de Japón como *Rapana venosa* (Ito *et al.* 2004), donde STX, neoSTX y dcSTX son las principales toxinas encontradas en gasterópodos.

En el bivalvo *Tagelus dombeii* se determinó una concentración de 99  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g, cuyo perfil estuvo dominado por STX, identificándose además GTX-3 y GTX-2, siendo GTX-2 de mayor concentración, patrón que es reiterativo dentro de los perfiles de moluscos intoxicados con VPM (Lagos 2003).

### **Toxinas lipofílicas**

Las toxinas AO y DTX-1 han sido ampliamente estudiadas en Chile siendo *Dinophysis acuta* el productor de estas toxinas (García *et al.* 2004). Una de las especies de la que se tiene mayor registro corresponde a *Mytilus edulis chilensis* (Zhao *et al.* 1993, García *et al.* 2001, García *et al.* 2004, 2005, 2006 y 2010). En las muestras analizadas de las Islas Huichas DTX-1 estuvo presente en un 24,6% de las muestras, alcanzando altos valores en especies como *Choromytilus chorus*

(345,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), *Venus antiqua* (217,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), *Aulacomya ater* (287,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y *Gari solida* (213,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) valores que en todos sus casos superan la norma internacionalmente establecida de 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sin embargo, en la especie *M. edulis chilensis* desde el sector de Islas Huichas no se detectó AO ni DTX-1, resultados que distan a los publicados por García *et al.* (2004, 2005, 2006 y 2010), en donde los perfiles identifican a AO a concentraciones de 36,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , situación que es planteada igualmente por Zhao *et al.* (1993).

La presencia de PTXs en Chile ha sido reportada en la especie *Dinophysis acuminata* por Blanco *et al.* (2007), Krock *et al.* (2009) y por Fux *et al.* (2011) siendo la única toxina identificada en los perfiles PTX-2. Los resultados obtenidos a través de los análisis reafirman lo expuesto, ya que en los perfiles evaluados en las diferentes especies sólo se detectó PTX-2 con un rango de toxicidad de entre 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 67,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , variación asociada al tipo de especies evaluadas. La tabla 23 muestra las máximas concentraciones de PTX-2 encontradas en las 9 especies analizadas, a excepción de la Navajuela, siendo el primer registro de estas toxinas en los recursos estudiados, ya que hasta la fecha no existen publicaciones al respecto.

**Tabla 23.** Lugares de muestreo, especie y máxima concentración de PTX-2 encontrada en las muestras de Islas Huichas, Región de Aysén. Valores expresados en  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Especie	Concentración PTX-2 ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
1	Isla Vergara	45.198162s	73.537395w	<i>V. antiqua</i>	56,7
1	Isla Vergara	45.198162s	73.537395w	<i>A. psittacus</i>	45,1
2	Isla Viel	45.205010s	73.581064w	<i>A. ater</i>	46,2
6	Islote La Garza	45.223340s	73.620868w	<i>A. ranelliformes</i>	18,1
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	<i>C. chorus</i>	34,6
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	<i>C. concholepas</i>	11,53
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	<i>M. edulis chilensis</i>	21,8
29	Isla Atenais	45.241406s	73.581214w	<i>Gari Solida</i>	67,9

Por otro lado, YTX fue una de las toxinas más abundantes dentro de las especies evaluadas (41,8%), siendo *Austromegabalanus psittacus* la única especie en la que no se detectó. La máxima concentración se determinó en el gasterópodo *Concholpas concholepas* proveniente de Isla Luchín (45.044544s, 73.422865w) con un valor promedio de 91,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sin embargo, la toxina destacó por su presencia en la especie *Aulacomya ater*, detectándose en un 85,7% de los casos. La presencia de estas toxinas en Chile ha sido reportada por Yasumoto & Takizawa (1997) en *Mytilus edulis chilensis* provenientes del Archipiélago los Chonos, en *Mesodesma donacium* y *Mulina edulis* (Álvarez *et al.* 2010) y en muestras de plancton hechas por Krock *et al.* 2009 en la bahía de Arica y en Bahía Mejillones por Álvarez *et al.* (2011) provenientes desde un florecimiento de *Protoceratium reticulatum* detectándose concentraciones de YTX fue entre 0,2 a

0,4 pg cel<sup>-1</sup>. En los canales y fiordos del sur de Chile la presencia tanto de quistes como de células vegetativas es común (Seguel *et al.* 2005 y 2010, Seguel & Sfeir 2010) lo que explica la alta incidencia de estas toxinas en las muestras, siendo este el primer registro de esta toxina en las especies estudiadas (tabla 24).

**Tabla 24.** Lugares de muestreo, especie y máxima concentración de YTX encontrada en las muestras de Islas Huichas, Región de Aysén.

Zona	LUGAR	LATITUD	LONGITUD	Especie	Concentración YTX (µg/Kg)
9	Islas Herraduras	45.186551s	73.472231w	<i>C. chorus</i>	46,7
14	Punta Riel	45.190166s	73.358193w	<i>A. ater</i>	35,2
21	Isla Ñancul	45.038287s	73.437435w	<i>Gari Solida</i>	18,7
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	<i>T. dombeii</i>	9,61
22	Isla Luchín	45.044544s	73.422865w	<i>C. concholepas</i>	91,4
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	<i>A. ranelliformes</i>	32,1
23	Isla Luchín	45.075572s	73.432999w	<i>M. edulis chilensis</i>	12,7
29	Isla Atenais	45.237966s	73.577138w	<i>V. antiqua</i>	12,0

Los invertebrados marinos colectados en el sector de Islas Huichas, Región de Aysén presentaron altas toxicidades de toxinas paralizantes y de toxinas lipofílicas (AZA-1, PTX-2 e YTX) en especies de las que no existían registro científico. Por otro lado, la presencia simultánea de toxinas paralizantes y toxinas lipofílicas (AZA-1, PTX-2 e YTX), es otro punto importante del que no se tiene registro en el país salvo por estudios realizados por García *et al.* (2005), en los que se detectó simultáneamente VDM (DTX-1) y VPM en *Mytilus chilensis*. Además, estos resultados demuestran que los métodos utilizados en Chile (bioensayo de ratón) para la detección de VDM son poco específicos, debido a que no es posible

determinar el tipo de toxinas ni su concentración, por lo que el cambio de normativa y métodos de identificación y/o cuantificación para el análisis de este tipo de toxinas es un tema relevante.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se determinaron los perfiles tóxicos de toxinas lipofílicas (AO, DTX-1, AZA, PTX e YTX) y toxinas paralizantes (STX, neoSTX, GTX-4/GTX-1, GTX-5 y GTX-3/GTX-2) en invertebrados marinos del sector de Islas Huichas, Región de Aysén.

Las muestras presentaron altas concentraciones de toxinas paralizantes estando el 82,4% de ellas por sobre la norma de 80  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g de carne de molusco, siendo 7.092  $\mu\text{g}$  STX eq/100 g la máxima concentración detectada en *Gari solida* en Punta Quintana (45.199729s, 73.513791w). El perfil de toxinas paralizantes estuvo compuesto en un 91,2% de STX, 44,4 % de neoSTX, 93,4% de GTX-3/GTX-2, 54,2% de GTX-4/GTX-1 y 89,6% de GTX-5, siendo las GTXs las más abundantes.

El perfil de toxinas lipofílicas estuvo compuesto por AO (26,4%), DTX-1 (29,7%), AZA-1 (61,5%), PTX-2 (26,4%) y YTX (41,8 %). Los máximos valores de cada toxina fueron de 36,2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de AO en *Venus antiqua*, 345,7  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DTX-1 en *Choromytilus chorus*, 45,1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de AZA-1 en *Venus antiqua*, 67,9  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de PTX-2 en *Gari solida* y 91,4  $\mu\text{g}$  YTX/Kg de YTX en *Concholepas concholepas*.

Por otro lado, este es el primer registro de toxinas lipofílicas dentro de las especies estudiadas en las que:

- AZA-1 fue detectada en las especies: *Venus antiqua*, *Aulacomya ater*, *Gari solida*, *Choromytilus chorus*, *Concholepas concholepas*, *Argobuccinum ranelliformes* y *Austromegabalanus psittacus*.
- YTX fue detectada en las especies: *Venus antiqua*, *Aulacomya ater*, *Gari solida*, *Choromytilus chorus*, *Concholepas concholepas*, *Argobuccinum ranelliformes* y *Tagelus dombeii*.
- PTX-2 fue detectada en las especies: *Venus antiqua*, *Aulacomya ater*, *Mytilus edulis chilensis*, *Gari solida*, *Choromytilus chorus*, *Concholepas concholepas* y *Argobuccinum ranelliformes*.

Además, este es el primer estudio en donde se identifica simultáneamente la presencia de las distintas toxinas lipofílicas en conjunto con toxinas paralizantes, situación que no descrita en estudios previos.

Toda esta evidencia revela el alto riesgo al cual está sometida la población consumidora de mariscos, por lo que surge la necesidad de un cambio en la normativa sanitaria y en los métodos de detección en toxinas lipofílicas, por lo que se recomienda establecer estudios a largo plazo de monitoreo de especies fitoplanctónicas causantes de FAN asociadas a estas toxinas, posibles especies vectores, producción de material de referencia para determinar concentraciones de las toxinas y, por último, el monitoreo mediante LC-MS/MS para la determinación y cuantificación de toxinas tanto en especies productoras, como en organismos vectores.

## REFERENCIAS

**Aasen J, Hardstaff W, Aune T & M Quilliam. 2006.** Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 1531–1537.

**Álvarez G, Uribe E, Ávalos P, Mariño C & J Blanco. 2010.** First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicon* 55 (2-3): 638-641.

**Álvarez G, Uribe E, Díaz R, Braun M, Mariño C & J Blanco. 2011.** Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in Northern Chile. *Journal of Sea Research* 65 (4): 427-434.

**Amzil Z, Sibat M, Royer F & V Savar. 2008.** First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish. *Toxicon* 52: 39–48.

**Avaria S. 1999.** Marea Roja: Perspectiva Científica. *Revista de Sanidad de la Defensa Nacional* 9: 92-99.

**Bauder A, Cembella A, Bricelj V & M Quilliam. 2001.** Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Marine Ecology Progress Series* 213: 39-52.

**Blanco J, Álvarez G & E Uribe. 2007.** Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cell of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon* 49: 710-716.

**Compagnon D, Lembeye G, Marcos N, Ruiz-Tagle N & N Lagos. 1998.** Accumulation of PSP toxins in the bivalve *Aulacomya ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during an *Alexandrium catenella* bloom in southern Chile. *Journal of Shellfish Research* 17: 67-73

**Danaras A, M Norte & J Fernandez. 2001.** Review: toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101-1132.

**Dominguez H, Paz B, Daranas A, Norte M, Franco J & J Fernández. 2010.** Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human implications. *Toxicon* 56: 191-217.

**European Union. 2011.** Commission Regulation N° 15/2011 of 10 January 2011, amending Regulation (EC) N° 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Union* L6: 3 - 4.

**Falconer I. 1996.** Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia* 35: 6-11.

**Furey A, O'Dothery S, O'Callaghan K, Lehane M & J Kevin. 2010.** Azaspirácid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations. *Toxicon* 56: 173-190.

**Fux E, McMillan D, Bire R & P Hess. 2007.** Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *Jornal of Chromatography* 1157: 273-280.

**Fux E, Smith J, Tong M, Guzmán L & D M. Anderson. 2011.** Toxins profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicon* 57: 275-287.

**Fujiki H, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M, Yasumoto T & T Sugimura. 1988.** Diarrhetic shellfish toxins, DTX-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn Jornal of Cancer Research* 79: 1089–1093.

**García C. 2001.** Determinación de Toxinas Diarreicas presentes en Moluscos, un problema de contaminación natural. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, Mención Ciencias Ambientales y Biomedicina. Universidad de Chile, Santiago.

**García C, Mardones P, Sfeir A & N Lagos. 2004.** Simultaneous presence of paralytic and diarrhetic shellfish poisoning in *Mytilus chilensis* samples collected in the Chiloe Island, austral Chilean Fjord. *Biological Research* 37: 721-731.

**García C, Truan D, Lagos M, Santelices J, Díaz J & N Lagos. 2005.** Metabolic transformation of dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxin contaminated shellfish. *Journal Toxicology Science* 30: 287-296.

**García C, Schonstedt V, Santelice J & N Lagos. 2006.** High amount of Dinophysistoxin-3 in *Mytilus chilensis* collected in seno de Reloncaví, Chile, during massive human intoxication associated with outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Toxicological Sciences* 31 (4): 305-314.

**García C, Pruzzo M, Rodríguez-Unda N, Contreras C & N Lagos. 2010.** First evidence of Okadaic acid acyl-derivative and Dinophysistoxin-3 in mussel samples collected in Chiloe Island, Southern Chile. *The journal of Toxicological Sciences* 35 (3): 335-344.

**Gerssner B, Bell P, Doucette G, Moczydlowski E, Poli M, Dolah F & S Hall. 1997.** Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon* 35 (5): 771-722.

**Gerssen A, Pol-Hofstad I, Poelman M, Mulder P, Van den Top H & J de Boer. 2010.** Marine Toxins: Chemistry, Toxicity, Occurrence and Detection, with Special Reference to the Dutch Situation. *Toxicon* 2: 878-904.

**Gerssen A, Patrick P & J Boer. 2011.** Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 685: 176-185.

**González V. 2003.** Purificación de las toxinas del veneno diarreico de molusco presentes en Choritos (*Mytilus chilensis*) de isla Cailin, Chiloé. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Santiago. 61 pp.

**Guzmán L, Campodónico I & S Hermosilla. 1975.** Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. I. Distribución espacial y temporal de *G. catenella*. *Anales del Instituto Patagónico, Punta Arenas (Chile)*. 4:173–183.

**Guzmán L & BSuárez. 1998.** Floraciones de algas nocivas, mareas rojas y toxias marinas. Instituto de Fomento Pesquero, Chile. 56pp.

**Hall S, Strichartz G, Moczydlowski E, Ravindran A & P Reichardt. 1990.** The saxitoxins; sources, chemistry, and pharmacology. In: *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*. Eds., Hall, A., and Strichartz, G. American Chemical Society Symposium series 418. Washington, DC: American Chemical Society. pp. 29-65.

**Hallegraeff G. 1993.** A Review of harmful algal bloom and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79- 99.

**Hallegraeff G. 1995.** Harmful Algal Blooms: a global overview. En: Hallegraeff G, Anderson A & Cembella (eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides 33, UNESCO: 1-22.

**Ito E, Satake M, Ofugi K, McMahon T, Silke J, James K & Yasumoto T. 2000.** Small intestine injuries in mice caused by a new toxin, azaspiracid, isolated from Irish mussels. En: Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms. 395-398.

**Ito E, Satake M, Ofuji K, Higashi M, Harigaya K, McMahon T & Yasumoto T. 2002.** Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40: 193-203.

**Ito K, Asakawa M, Beppu R, Takayama H & K Miyazawa. 2004.** PSP-toxicification of the carnivorous gastropod *Rapana venosa* inhabiting the estuary of Nikoh River, Hiroshima bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Marine Pollution Bulletin* 48: 116-1121.

**Jung J, Sim C & C Lee. 1995.** Cytotoxic compounds from a two- sponge association. *Journal of Natural Products* 58: 1722–1726.

**Kat M. 1979.** The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. *Toxic dinoflagellate blooms*. Elsevier, Amsterdam: 215-220.

**Krock B, Seguel C & A Cembella. 2007.** Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6: 734-744.

**Krock B, Seguel C, Valderrama K & U Tillmann. 2009.** Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon* 54: 364-367.

**Lagos N. 1998.** Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile. *Biological Research* 31: 375-386.

**Lagos N, Onodera H, Zagatto P, Andrinolo D, Azevedo S & Y Oshima. 1999.** The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.

**Lagos N. 2002.** Principales toxinas de origen fitoplanctónicas: Identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En: Sar E, Ferrario M & B Reguera (eds). *Floraciones Algales nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía: 57-76.

**Lagos N. 2003.** Paralytic Shellfish Poisoning Phycotoxins: Occurrence in South America. *Comments on Toxicology* 9: 175-193.

**Lembeye G. 2006.** Florecimientos algales nocivos en aguas australes. En: N. Silva & S. Palma (ed). Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. 99-103.

**Long R, Sargent, J & K Hammer. 1990.** Paralytic shellfish poisoning: A case report and serial electrophysiologic observations. *Neurology* 40: 1310-1311.

**Lopez I, Sánchez B, Montebruno D, Fernández V, Pinilla J, Pinochet C, Valdebenito J, Ross M, Alvarez M, Rubina J & E Vogel. 1992.** Cuadro clínico de la intoxicación masiva con veneno paralizante de mariscos. *Revista de Sanidad Defensa Nacional* 9: 120 – 125.

**López-Rivera A, O'Callaghan K, Moriarty M, O'Driscoll D, Hamilton B, Lehane M, James H & A Furey. 2010.** First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) in two regions of Chile. *Toxicon* 55: 692-701

**McMahon T & J Silke. 1996.** West coast of Ireland; winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14:2.

**Miles C, Wilkins A, Samdal I, Sandvik M, Petersen D, Quilliam M, Naustvoll L, Jensen D & J Cooney. 2004.** A novel pectenotoxin, PTX-12, in Dinophysis spp. and shellfish from Norway. *Chemical Research in Toxicology* 17: 1423–1433.

**Miles C, Wilkins A, Selwood A, Jensen D, Cooney J, Beuzenberg V & A Mackenzi. 2006.** Identification of 45-hydroxy-46, 47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45, 46, 47-trinoryessotoxin, and 9 methyl-42, 43, 44, 45, 46, 47, 55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxin, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47: 229-240.

**Molinet C, Lafón A, Lembeye G & CA Moreno. 2003.** Patrones de distribución espacial y temporal de floraciones de *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech 1985, en aguas interiores de la Patagonia noroccidental de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 681-698.

**Morgan K, Larkin S & C Adams. 2009.** Firm-level economic effects of HABS: A tool for business loss assessment. *Harmful Algae* 8: 212–218.

**Muñoz P, Avaria S, Sievers H & R Pardo.1992.** Presencia de dinoflagelados tóxicos del género *Dinophysis* en el seno de Aysén, Chile. *Revista de Biología Marina* 27: 187-212.

**Murata M, Masanori K, Lee J & Yasumoto T. 1987.** Isolation and structure of yessotoxin, a novel poyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.* 28: 5869-5872.

**Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James K, Naoki H, Oshima Y & T Yasumoto. 1999.** Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Natural Toxins* 7: 99-102.

**Ogino H, Kumagai M & T Yasumoto. 1997.** Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins* 5: 255-259.

**Onodera H, Satake M, Oshima Y, Yasumoto T & W Carmichael. 1997.** New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural Toxins* 5: 146-151.

**Oshima Y. 1995a.** Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxin in marine organisms. En: Lassusp, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (ed). *Harmful marine algal blooms* 474-448. *Technique et Documentation-Lavoisier, Intercept Ltd.*

**Oshima Y. 1995b.** Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78: 528-532.

**Oshima Y. 1999.** The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.

**Paz B, Daranas A, Norte M, Riobó P, Franco J & J Fernández. 2008.** Yessotoxin, a group of marine polyether toxins: an overview. *Marine Drugs* 6: 73–102

**Pereira P, Onodera H, Andrinolo D, Franca S, Araujo F, Lagos N & Y Oshima. 2000.** Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacteria

*Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38: 1689 – 1702.

**Programa Nacional Integrado de Mareas Rojas o Floraciones Algales Nocivas. 2010.** Agencia Chilena para la inocuidad alimentaria. 41 pp.

**Reguera B 2003.** Biología, autoecología y toxicología de las principales especies del género *Dinophysis* asociados a episodios de intoxicación diarreogénica por bivalvos (DSP). Tesis Doctoral Instituto Español de Oceanografía, C.O. de Vigo Departamento de Ecología, Universidad de Barcelona. 298 pp.

**Ronzitti G, Hess P, Rehmann N & G Rossini. 2007.** Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells. *Toxicological Science* 95: 427–435.

**Satake M, Ofuji K, Naoki H, James K, Furey A, McMahon T, Silke J & T Yasumoto. 1998.** Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society* 120: 9967-9968.

**Schantz E, Ghazarossian V, Schones H & F Strong. 1975.** The Structure of Saxitoxin. *Journal of the America Chemical Society* 97:1238-1239.

**Seguel M, Tocornal M & A Sfeir. 2005.** Floraciones algales nocivas en canales y fiordos del sur de Chile. *Ciencia y Tecnología del Mar*. 28 (2): 5-13.

**Seguel M. 2008.** Manejo de cultivos bivalvos contaminados con marea roja. En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 309-316.

**Seguel M, Sfeir A & V Albornoz. 2010.** Floraciones de microalgas tóxicas en la Región de Aysén y su relación con larvas de peces. *Ciencia y Tecnología del Mar* 33 (1): 31-42.

**Seguel M & A Sfeir. 2010.** Distribución de las toxinas marinas y quistes de dinoflagelados tóxicos en los canales occidentales de la Región de Aysén. *Ciencia y Tecnología del Mar* 33 (1): 43-55.

**Shimizu Y. 1993.** Microalgal metabolites. *Chemical Review* 93: 1685-1698.

**Sournia A, Chretiennot-Dinet MJ & M Ricard. 1991.** Marine phytoplankton: How many species in the world ocean. *Journal of Plankton Research* 13: 1093-1099.

**Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K & T Sugimura. 1988.** Okadaic acid: a new non-12-O-tetradecanoyl phorbol acetate type tumour promoter. *Proceedings national Academy Science U.S.A.* 85: 1768-1773.

**Suzuki T, Ota H & M Yamasaki. 1999.** Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37: 187-198.

**Tillman U, Elbrachter M, Krock B, John U & A Cembella. 2009.** *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44: 63–79.

**Torgersen T, Sandvik M, Lundve B & S Lindegarth. 2008.** Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*). *Toxicon* 52: 418-427.

**Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, Altinier G, Vita F, Melato M, Satake M & T Yasumoto. 2003.** Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41: 783-792.

**Twiner M, Hess P, Dechraoui M, McMahon T, Samons M, Satake M, Yasumoto T, Ramsdell J & G Doucette. 2005.** Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* 45: 891–900.

**Twiner M, Rehmann N, Hess P & G Doucette. 2008.** Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology and toxicology with an emphasis on human health impact. *Marine Drugs* 6: 39–72.

**Vale P & M Sampayo. 2002.** Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. *Toxicon* 40: 979–987.

**Vale P, Botelho M, Rodrigues S, Gomes S & M Sampayo. 2008.** Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae* 7: 11–25.

**Vareltzis P & I Undeland. 2008.** Removal of lipids and Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxin from Blue Mussels (*Mytilus edulis*) during Acid and Alkaline Isolation of Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3675-3681.

**Yasumoto T, Oshima Y & M Yamaguchi. 1978.** Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 44: 1249-1255.

**Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto G & J Clardy. 1985.** Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41: 1019-1025.

**Yasumoto T & M Murata. 1993.** Marine Toxins. *Chemical Reviews* 93: 1897-1909.

**Yasumoto T & A Takizawa 1997.** Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61: 1775-1777.

**Zhao J, Lembeye G, Cenci G, Wall B & T Yasumoto. 1993.** Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Itali and Ireland. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. 587-592.