

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**



**“VALIDACIÓN DEL ENSAYO RECEPTOR LIGANDO, PARA LA DETERMINACIÓN DE SAXITOXINA EN MOLUSCOS BIVALVOS, UTILIZANDO EXTRACTOS SINÁPTICOS OBTENIDOS DE CERDO”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR**

**NUBIA PATRICIA PARADA HERRERA**

**WILFREDO ERNESTO RIVERA TORRES**

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

**LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DOCENTES DIRECTORES**

**DR. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO**

**LIC. OSCAR ARMANDO AMAYA MONTERROSA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, NOVIEMBRE 2016**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

RECTOR INTERINO

**LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLÓN**

SECRETARIA GENERAL

**DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA**

FISCAL GENERAL

**LICDA. NORA BEATRIZ MELÉNDEZ**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

DECANO

**LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA**

SECRETARIA

**LIC. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS**

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

**DR. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios.**

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

### **A mis abuelitos María de los Ángeles de Herrera y Atilio Herrera.**

Por todo su Amor y apoyo incondicional, por sus consejos y por siempre desear grandes cosas para mí. Los Amo y les agradezco infinitamente

### **A mi Mamá Nuvia Herrera Turcios y mi Tía Melany Herrera Turcios.**

Por todo su apoyo durante todo este proceso, por su paciencia, dedicación y por estar siempre a mi lado. Los Amo y les agradezco infinitamente.

### **Mis hermanos Esmeralda Parada y Atilio Antonio Parada.**

### **Mi Esposo Moisés Joel Rivera y mi Hermosa Hija Adriana Sofía Rivera Parada.**

Por su Amor, su apoyo incondicional, por ser mi motivo y fuerza para seguir adelante, por creer en mí y siempre decirme que yo podía hacerlo. Los Amo y les agradezco.

### **Mis sobrinos, Alexander, Atilito y Ángel.**

Para quienes quiero ser un buen ejemplo a seguir.

### **A Wilfredo Rivera.**

### **Todos mis amigos.**

Por compartir los buenos y malos momentos.

**Nubia Patricia Parada Herrera**

**A Dios.**

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

**A mis padres Irma Haydeé Torres de Rivera y José Salvador Rivera.**

Por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron. Papas gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto lo debo a ellos.

**Mis hermanos Carmen Rivera, José Rivera y Marixsa Rivera.**

Por estar conmigo, quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes, los quiero mucho.

**Mi sobrino, Alexander Rivera.**

Mi motor para seguir cuando ya no quiero levantarme, para que veas en mí un ejemplo a seguir.

**A Nubia Parada.**

Por compartir este viaje conmigo, los lazos de amistad se unieron mas. Siempre para adelante contra el mundo.

**A todos mis amigos.**

Por compartir los buenos y malos momentos.

**Wilfredo Ernesto Rivera Torres**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la finalización de este trabajo y en particular a las siguientes personas:

Al Dr. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO y al Lic. OSCAR ARMANDO AMAYA MONTERROSA, asesores de este trabajo de investigación, por sus constantes enseñanzas, consejos, estímulo a seguir adelante y en especial a la dedicación y ayuda humana que siempre hemos recibido de ellos.

A nuestras familias principalmente a nuestros padres y hermanos por su paciencia y ayuda incondicional.

# I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	i
1.1	ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
1.2	ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
II.	INTRODUCCIÓN .....	1
III.	OBJETIVOS .....	3
3.1	General .....	3
3.2	Específicos .....	3
IV.	FUNDAMENTO TEÓRICO .....	4
4.1	Generalidades .....	4
4.1.1	Organismo productor .....	6
4.2	Toxinas PSP .....	8
4.2.1	Farmacología y toxicidad .....	10
4.2.2	Efectos sobre la salud y el medio ambiente .....	10
4.3	Canales iónicos .....	12
4.3.1	Canales de sodio dependientes de voltaje .....	12
4.3.2	Farmacología molecular del canal de sodio .....	13
4.4	Métodos de detección .....	14
4.4.1	Métodos analíticos .....	15
4.4.2	Bioensayo .....	15
4.5	Ensayo receptor ligando (RBA) para toxinas de algas .....	16
4.5.1	Principio del ensayo receptor ligando .....	18
4.6	Validación del método .....	18
4.6.1	Algunos de los parámetros para la validación .....	20
4.6.1.1	Linealidad .....	20

4.6.1.2	Precisión.....	22
4.6.1.3	Exactitud .....	24
4.6.1.4	Limite de detección.....	25
V.	METODOLOGÍA.....	26
5.1	Delimitación espacial .....	26
5.2	Elaboración de los extractos sinápticos de cerebro de cerdo.....	26
5.3	Determinación del contenido proteico.....	27
5.4	Efectividad de la proteína como receptor.....	29
5.5	Extracción de saxitoxina de muestras de ostras.....	30
5.6	Validación del ensayo receptor ligando para moluscos bivalvos.....	31
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
6.1	Elaboración de los extractos sinápticos de cerebro de cerdo.....	34
6.2	Determinación del contenido proteico.....	35
6.2.1	Elaboración de la curva de calibración para la determinación del contenido proteico.....	35
6.2.2	Determinación del contenido de proteína en muestras de cerebro de cerdo preparado localmente.....	36
6.2.3	Determinación del contenido de proteína en muestras de cerebro estándar.....	41
6.3	Determinación de la efectividad de la proteína como receptor.....	46
6.3.1	Curva de calibración de STX utilizando extracto sináptico de cerdo estándar como receptor y análisis de muestras desconocidas.....	46
6.3.2	Curva de calibración de STX utilizando extracto sináptico de cerdo preparado localmente como receptor y análisis de muestras desconocidas.....	54
6.4	Validación del ensayo receptor ligando para moluscos bivalvos.....	61
6.4.1	Linealidad .....	61
6.4.2	Precisión .....	61

6.4.3	LOD.....	62
VII.	CONCLUSIONES.....	64
VIII.	RECOMENDACIONES.....	65
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
X.	ANEXOS.....	75
9.1	Anexo 1 “Preparación de membrana de cerebro de rata”.....	75
9.2	Anexo 2 “Ensayo BCA” .....	77
9.3	Anexo 3 “Extracción de STX” .....	81
9.4	Anexo 4 “Protocolo Receptor Binding Assay”.....	83
9.5	Anexo 5 “Eliminación de datos anómalos” .....	88
9.6	Anexo 6 “Abreviaturas” .....	89



## 1.1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura, y factores de toxicidad equivalente de STX.	9
Tabla 2. Preparación de disoluciones estándar para la curva de calibración.	27
Tabla 3. Curva de calibración STX no marcado.	29
Tabla 4. Criterios de aceptación para parámetros estadísticos.	33
Tabla 5. Peso reales de la muestra de extracto sináptico.	34
Tabla 6. Valores de absorbancia para la curva de calibración.	35
Tabla 7. Factor de dilución aplicada a cada criovial y su respectivo valor de absorbancia.	37
Tabla 8. Determinación de concentración de proteína en extractos sinápticos de cerebro de cerdo.	38
Tabla 9. Valor de concentración final en extractos sinápticos	39
Tabla 10. Datos de absorbancia para las muestras a dilución 100 $\mu$ L a 1000 $\mu$ L.	40
Tabla 11. Concentración de proteína	40
Tabla 12. Determinación del coeficiente de variación.	41

Tabla 13. Factor de dilución aplicada a cada criovial y su respectivo valor de absorbancia.	42
Tabla 14. Valores de concentración de proteína en extractos de cerebro de cerdo estándar.	43
Tabla 15. Valores de concentración final en extractos de cerebro de cerdo estándar.	44
Tabla 16. Datos de absorbancia para las muestras a dilución 100 $\mu$ L a 1000 $\mu$ L.	44
Tabla 17. Concentración de proteína.	45
Tabla 18. Determinación del coeficiente de variación.	45
Tabla 19. Curva de calibración STX no marcada.	46
Tabla 20. Configuración de la placa de 96 pocillos.	47
Tabla 21. Datos obtenidos de las cuentas por minuto en el Microbeta Trilux.	48
Tabla 22. Determinación de la desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación para los valores de CPM: (a) curva de calibración; (b) muestra desconocida.	49 (a) 49 (b)
Tabla 23: parámetros estadísticos determinados a partir de la curva de calibración.	51
Tabla 24. Determinación de la concentración de las muestras desconocidas.	51

Tabla 25. Valores finales de coeficiente de variación y concentración de STX en las muestras problema.	52
Tabla 26. Determinación del LOD.	53
Tabla 27. Curva de calibración STX no marcada.	54
Tabla 28. Configuración de la placa de 96 pocillos.	55
Tabla 29. Datos obtenidos de las cuentas por minuto en el Microbeta Trilux.	56
Tabla 30. Determinación de la desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación para los valores de CPM (a) curva de calibración; (b) muestra desconocida.	56 (a) 57 (b)
Tabla 31: parámetros estadísticos determinados a partir de la curva de calibración.	58
Tabla 32. Determinación de la concentración de las muestras desconocidas, determinados por extrapolación de la curva estándar.	59
Tabla 33. Valores finales de coeficiente de variación y concentración de STX en las muestras problema.	60
Tabla 34. Determinación del LOD.	60
Tabla 35. Comparación de parámetros estadísticos para la determinación de contenido proteico.	61

Tabla 36. Comparación de parámetros estadísticos para el RBA.	63
Tabla 37. Abreviaturas (Anexo 4).	89

## 1.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa que muestra la distribución global de las toxinas PSP a partir del año 2009.	7
Figura 2. Estructura química de saxitoxina.	8
Figura 3. Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje	14
Figura 4. Ecuación química del BCA	28
Figura 5. Gráfico y su respectiva ecuación de linealidad	36
Figura 6. Curva de calibración utilizando como receptor extracto sináptico de cerebro de cerdo estándar.	50
Figura 7. Curva de calibración utilizando como receptor extracto sináptico de cerebro de cerdo preparado localmente.	58
Figura 8. Comparación entre curvas de calibración.	62

## II. INTRODUCCIÓN

Muchos países enfrentan problemas con la toxicidad de los mariscos relacionados a floraciones de algas nocivas (FAN). Uno de los problemas más graves y ampliamente distribuidos a causa de dicha proliferación microalgal, es la intoxicación paralítica por marisco (PSP por sus siglas en inglés Paralytic Shellfish Poison), esta intoxicación es causada por la liberación de toxinas PSP que son un grupo de 21 tetrahidropurinas estrechamente relacionadas cuya toxicidad difiere ampliamente. La más tóxica es la saxitoxina (STX), la primera toxina PSP caracterizada químicamente. [1]

Los eventos de proliferaciones microalgales relacionados con PSP, son causados por miembros de varios géneros de dinoflagelados (microorganismo unicelular, que forma parte del fitoplancton marino y de agua dulce) que varían de acuerdo a la región afectada.[3] Los problemas de intoxicación surgen por el consumo de las algas tóxicas que se encuentran en bivalvos filtradores, zooplancton y peces planctívoros que pueden acumular estas toxinas, lo que las introduce en las redes alimentarias marinas y afectando los niveles más altos de la cadena trófica, por ejemplo: tortugas marinas, aves y ocasionalmente en seres humanos.[3]

La mayoría de los países con un historial de ocurrencia de PSP, tienen un programa de vigilancia para salvaguardar la salud pública y satisfacer las necesidades de los productores comerciales de mariscos. Actualmente, muchos países utilizan el bioensayo en ratón para este propósito, un método reconocido oficialmente por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) en 1997. [1]

Existen otras técnicas disponibles para la detección de toxinas PSP, las cuales pueden ser de tres tipos:

1. Fundamentados en anticuerpos contra las toxinas PSP.
2. Fundamentados en la viabilidad celular.
3. Fundamentados en la unión de las toxinas PSP a receptores específicos.

Por ejemplo, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), HPLC/MS (Liquid chromatography- mass spectrometry) y recientemente el ensayo receptor ligando (RBA por sus siglas en inglés Receptor Binding Assay, AOAC 2011.27). En la actualidad, estas técnicas de análisis se consideran más adecuadas para la investigación y no con fines de vigilancia. [2]

El codex alimentarius clasifica al RBA como una técnica de análisis del tercer tipo; el cual se basa en la interacción de alta afinidad entre las toxinas PSP y su objetivo farmacológico, el canal de sodio dependiente de voltaje y se considera como una alternativa muy prometedora para el reemplazo del bioensayo en ratón. [1] Actualmente se tiene validado por la AOAC. [27]

El RBA es un ensayo de unión competitiva en el cual, dos tipos de saxitoxinas (STX): una marcada con tritio ( $[^3\text{H}]\text{STX}$ ) y una no marcada (STX) que puede ser un estándar o una muestra problema, compiten por el sitio activo del receptor: sitio 1, que se encuentra en la sub unidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje, en una preparación de membrana de cerebro de rata.[3], [4] Recientemente se han estudiado otras alternativas utilizando cerebro de cerdo.

Tras el establecimiento de equilibrio de unión a  $4^\circ\text{C}$ , la toxina marcada no unida  $[^3\text{H}]\text{STX}$  se elimina por filtración y la  $[^3\text{H}]\text{STX}$  que se adhiere a los sitios, se cuantifica por recuento de centelleo líquido. La concentración de la toxina en las muestras se determina en referencia a la curva estándar. La incubación se lleva a cabo en un formato de microplaca para minimizar la manipulación de la muestra y la cantidad de radiactividad usada. [3]

En la presente investigación se plantea la validación del ensayo receptor ligando, para la determinación de saxitoxinas en muestras de moluscos proporcionadas por el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de El Salvador (LABTOX-UES). Utilizando preparación de membrana de cerebro de cerdo como receptor. Esta modificación al método oficial se realiza debido a que el uso de cerebro de rata es considerado como no ético, a demás para la obtención de dicho extracto sináptico de rata se generan muchos residuos, los cuales producen más contaminación. En cambio para el cerebro de cerdo en nuestro país es un desecho de la porcicultura, por tanto no se genera ningún tipo de contaminación.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1 General**

Validar el ensayo receptor ligando para la determinación de Saxitoxina en moluscos bivalvos utilizando extractos sinápticos preparados a partir de cerebros de cerdos.

### **3.2 Específicos**

- Establecer la relación óptima de disolución amortiguadora y del tejido de la corteza cerebral, para su uso en el ensayo del ácido bicinconínico. (BCA)
- Determinar el contenido proteico de los extractos sinápticos de cerebro de cerdo utilizando el ensayo del ácido bicinconínico.
- Determinar la efectividad de la proteína como receptor.
- Validar el ensayo receptor ligando para la determinación de saxitoxina en moluscos bivalvos en cumplimiento con la norma ISO/IEC 17025:2005.



## IV. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 4.1 Generalidades

Las floraciones de algas nocivas (FAN), son proliferaciones de ciertas especies de algas que causan daño a los seres humanos, la fauna y los ecosistemas mediante la producción de toxinas o al causar estrés físico-químico, debido a características como la morfología de las células (por ejemplo, las espinas), exudados (por ejemplo, surfactantes ) y altos niveles de biomasa (por ejemplo, hipoxia). Las FAN y sus potencialmente devastadores impactos de amplio alcance son ahora una amenaza bien establecida para los ecosistemas marinos y de agua dulce y los servicios que prestan. Estos eventos han seguido aumentando en frecuencia, duración y distribución a lo largo de las últimas décadas. [9], [10] Los organismos causales son predominantemente dinoflagelados, pero también incluyen las *diatomeas*, Raphidophytes y Haptophytes. [11]

Las floraciones de algas nocivas tóxicas son el foco principal de los esfuerzos presentes patrocinados por el organismo internacional de energía atómica (OIEA). Estas clases de microalgas son abundantes en los ecosistemas marinos costeros de todo el mundo y aunque las especies toxigénicas representan sólo cerca del 2% [11] del número total descrito, aun se siguen descubriendo nuevas especies productoras de toxinas [12] y la distribución de los taxones conocidos continúa expandiéndose [13], [16]. Se incluyen entre las muchas y variadas explicaciones para esta tendencia los factores tales como el enriquecimiento de nutrientes de origen antropogénicos, introducciones de agua de lastre, las actividades acuícolas mejoradas y, más recientemente, el cambio climático global. [10], [18]

Históricamente la costa salvadoreña ha sido afectada por episodios tóxicos de Marea Roja causando fallecidos, daños en la salud de la población, impacto negativo en la economía local y efectos adversos en la fauna y su entorno marino. [72]

En noviembre de 1989, El Salvador fue atacado por un evento tóxico de Marea Roja que abarcó desde Panamá hasta México, causando 99 intoxicados y 3 fallecidos principalmente en Guatemala y México. La especie causante fue identificada como *Pyrodinium bahamense*. [72]

De agosto de 2001 a enero de 2002, el Ministerio de Salud reportó 41 intoxicados por el consumo de moluscos, siendo el departamento de la libertad uno de los más afectados. A raíz de este episodio tóxico, se crea en el país la Comisión Nacional de Marea Roja (CONAMAR). [72]

Durante noviembre de 2005 a marzo de 2006 se documentó la proliferación de *Pyrodinium bahamense*, ocurriendo en altas densidades celulares ( $48,900 \text{ cel mL}^{-1}$ ) con rangos en saxitoxinas de 27.9- 627.8  $\mu\text{g STX eq/ 100g}$ . Se reportaron siete personas intoxicadas, tres fallecidos y al menos 206 tortugas marinas muertas. [72]

En 2007, se crea el Laboratorio de Toxinas Marinas en la Universidad de El Salvador, bajo la dirección del Licdo. Oscar Amaya, con apoyo del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la Organización Nacional Atmosférica y Oceanográfica de los Estados Unidos (NOAA). El cual desde el 2009 mantiene un monitoreo permanente de fitoplacton toxico y nocivo en la costa Salvadoreña. [72]

En agosto 2011, queda prohibida la extracción, comercialización y el consumo de almejas, mejillones, caracoles marinos y abulones debido a una marea roja que afecta las costas de México, Guatemala y El Salvador. [72]

En marzo de 2012, una intensa proliferación de *Cochlodinium polykrikoides* ocurrió principalmente desde las playas del puerto de La Libertad hasta La Perla en el departamento de La Libertad. Este episodio causó mortandad de peces bentónicos que vararon en las playas. En septiembre un evento producido por *Pyrodinium bahamense*, generó toxicidad la cual fue verificada en tejidos de ostras colectadas en Mizata por el Ministerio de Salud y enviadas al LABTOX-UES. [72]

Desde 28 de septiembre al 21 de octubre de 2013 se contabilizaron 233 tortugas marinas que arribaron muertas a diferentes playas de la costa salvadoreña principalmente al departamento de La Libertad. El LABTOX-UES analizó muestras de agua, en las que se determinó la presencia de especies de toxinas paralizantes. [72]

En El Salvador y a nivel mundial las comunidades costeras y los intereses económicos (por ejemplo, comerciales, de subsistencia, pesca recreativa, la acuicultura y el turismo) dependen de los recursos pesqueros y acuáticos afectados negativamente por las FAN.

Las estrategias de manejo y mitigación están siendo desarrolladas para reducir el alcance y la gravedad de los impactos de las FAN, con un énfasis en minimizar el riesgo de exposición humana a los mariscos contaminados.[10],[19] Entre las principales herramientas de gestión utilizadas para proteger la salud pública se encuentran los programas de vigilancia para detectar las toxinas de algas nocivas que se producen, tanto en las algas, así como también en los recursos pesqueros contaminados por estas toxinas. A su vez, hay un considerable esfuerzo para desarrollar y validar, métodos de bajo costo y de alto rendimiento que sean fiables para la detección de las toxinas de origen algal para el uso en aplicaciones de vigilancia y reglamentación.

Se han publicado un gran número de investigaciones sobre varios aspectos de las FAN, incluyendo su química, tóxico-farmacología, biosíntesis, genética, biotransformación, la distribución en el medio ambiente, la detección, efectos sobre la salud y los organismos que las producen.[20],[29]

#### **4.1.1 Organismo productor**

Los organismos responsables de la producción de la intoxicación paralizante por toxinas PSP incluyen dinoflagelados marinos dentro de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*, así como varios géneros de cianobacterias en gran parte de agua dulce (por ejemplo *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*). [2] Los dinoflagelados asociados a la producción de toxinas PSP se distribuyen a lo largo de las latitudes templadas, subtropicales y tropicales como se evidencia en un mapa de la US National Office for Harmful Algal Blooms, donde se documenta la distribución mundial de las toxinas PSP como se puede observar en la Figura 1. [2]

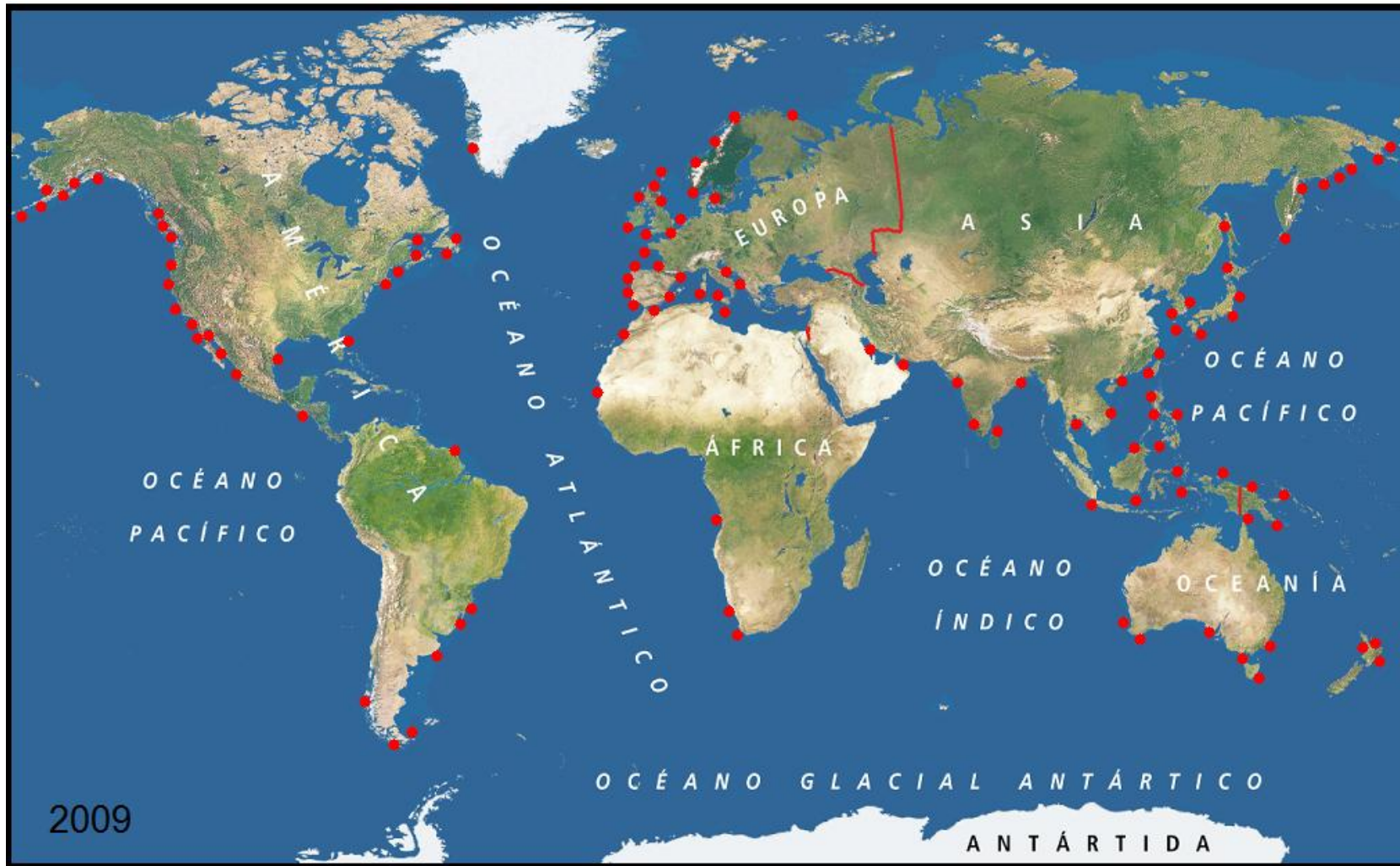


Figura 1. Mapa que muestra la distribución global de las toxinas PSP a partir del año 2009. Los círculos rojos indican ubicaciones con mediciones documentadas de saxitoxinas en muestras de moluscos, peces, o plancton. [2]

Algunos de los dinoflagelados asociados con PSP pueden alcanzar concentraciones que causan decoloración de las aguas superficiales. [22] Muchos de los taxones con frecuencia producen cantidades suficientes de toxina para causar contaminación de mariscos y problemas de salud humanos a concentraciones de sólo cientos de células por litro de agua de mar, niveles que no son visibles a simple vista. Por otra parte, la toxicidad de estos organismos es muy variable y depende del estado fisiológico o nutricional de las células. [23], [24] Como resultado de esta variación en la toxicidad, evaluar con precisión el riesgo asociado con un evento de floración requiere la capacidad de determinar la cantidad de toxina producida en las condiciones oceanográficas imperantes.

## **4.2 Toxinas PSP**

Las toxinas PSP comprenden un grupo mayor a 21 análogos de tetrahidropurina del compuesto original, saxitoxina (STX), que presentan cada uno una estructura química única y la correspondiente potencia tóxica. Estas toxinas generalmente se dividen en tres grupos según su estructura y potencia, dictada principalmente por sustituciones en la posición R4 como se puede observar en la Figura 2. [6]

Figura 2. Estructura química de saxitoxina, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, representan diferentes sustituyentes que dan origen a los derivados análogos que constituyen el grupo de toxinas paralizante de moluscos

Los principales análogos de la STX son: 1) los derivados del carbamato, 2) los análogos decarbamoil, y 3) los N-sulfocarbamoil, como se observa en la Tabla 1. La toxicidad específica de estos grupos de toxinas varía ampliamente siendo el grupo de las Carbamoil toxinas el más tóxico, intermedio el de las Decarbamoiltoxinas y muy poco tóxico el de las N-sulfocarbamoil toxinas. Estas toxinas son termoestables y no se destruyen durante el proceso de cocción. [6] Como resultado de su diversidad estructural, así como su toxicidad (que varía en varios órdenes de magnitud), la detección de las toxinas PSP representa un gran desafío en la investigación. Además, los organismos que sintetizan estos compuestos pueden exhibir una amplia variación en cuanto a las cantidades absolutas y relativas producidas por célula, y una vez incorporado en una matriz biológica de su metabolismo e interconversión, puede ser mediado tanto biológica (por enzimas) y químicamente (por pH). [6]

Tabla 1. Nomenclatura y factores de toxicidad equivalente (entre corchete) (saxitoxina STX = 1; STX toxicidad específica = 2483 unidades ratón/ $\mu$ mol; Oshima 1995) de la toxina paralizante de molusco seleccionada (gonyautoxin GTX, neosaxitoxin (NEO), decarbamoil-toxins (dc-)). nd = no data.[25]

			<b>Toxinas Carbamoil</b>	<b>Toxinas N-sulfocarbamoil</b>	<b>Toxinas Decarbamoil</b>
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> :OCONH <sub>2</sub>	R <sub>4</sub> :OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	R <sub>4</sub> :OH
H	H	H	STX [1]	B1 (GTX 5) [0.06]	dc-STX [0.51]
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GTX 2 [0.36]	C1 [0.01]	dc-GTX 2 [0.65]
H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX 3 [0.64]	C2 [0.10]	dc-GTX 3 [0.75]
OH	H	H	NEO [0.92]	B2 (GTX 6) [nd]	dc-NEO [nd]
OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GTX 1 [0.99]	C3 [0.01]	dc-GTX 1 [nd]
OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX 4 [0.73]	C4 [0.06]	dc-GTX 4 [nd]

### **4.2.1 Farmacología y toxicidad**

La STX y sus análogos se unen al sitio-1 en la subunidad alfa de los canales de sodio dependientes de voltaje, ( $\text{Na}^+$ ) bloqueando efectivamente el canal y la prevención de la generación de un potencial de acción. [34] La afinidad de unión y por tanto la potencia tóxica de las diferentes toxinas PSP varían considerablemente. [34]

La constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para la saxitoxina es cerca de 2 nM. La dosis letal para los seres humanos se estima en 1-4 mg de equivalentes de STX. Los síntomas clínicos son evidentes después de la ingestión de tan sólo 0.72 mg equivalentes de STX, mientras que las intoxicaciones graves son causados por 0.9 - 3.6 mg equivalentes de STX. [35] El inicio de los síntomas después de la exposición es rápida, menor a 1 hora, que suele comenzar con parestesias en los labios, la cara y las extremidades, seguido de somnolencia, ataxia, parálisis y finalmente la muerte por insuficiencia respiratoria en casos extremos. La eliminación de los análogos altamente solubles en agua de toxinas PSP se produce principalmente a través de la orina.

Incluso en pacientes que reciben una dosis suficiente para provocar paro respiratorio (y manteniéndolos con un ventilador artificial), se informó de la eliminación de la toxina de la sangre en un periodo de 24 horas dando a los pacientes una recuperación completa. [36]

### **4.2.2 Efectos sobre la salud y el medio ambiente**

Los niveles de tolerancia válidos actualmente para las ficotoxinas, se basan principalmente en datos de incidentes de intoxicación. Sin embargo, son pocas veces precisos y completos limitándose a toxicidad aguda. En algunos casos, el nivel de tolerancia se adapta también a las limitaciones del método de detección. Para el análisis de riesgos, debieran normalizarse los niveles de ingesta de mariscos en los seres humanos. [7]

La evaluación toxicológica de riesgos para las toxinas PSP puede basarse actualmente en datos de toxicidad. Las menores dosis que ocasionan síntomas leves de PSP en los seres humanos varían entre los 120  $\mu\text{g}$  y los 304  $\mu\text{g}$  por persona, en tanto que las más bajas

asociadas con intoxicaciones o muertes severas están entre los 456 µg y los 576 µg STX por persona. [7]

La principal vía de exposición humana a las toxinas PSP está bien documentada, para comprenderla se han estudiado diversas especies de moluscos bivalvos, que pueden diferir notablemente en su capacidad de acumular y metabolizar estos compuestos. [40] Las toxinas PSP se han implicado en amplios eventos de mortalidad de la fauna que involucran crustáceos, peces, aves marinas y tortugas marinas, [43], [44] incluida su presunta participación en la muerte de 14 ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) y más 100 focas monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) en peligro de extinción. [27] Estas toxinas también se han detectado en la ballena franca del Atlántico Norte en peligro de extinción (*Eubalaena glacialis*); [45] los efectos adversos para la salud o reproductivos todavía tienen que ser demostrados de manera concluyente. [7] Aunque generalmente no se asocia con la muerte de peces, una intensa proliferación de *Alexandrium tamarense* mayor a  $7 \times 10^5$  célulasL<sup>-1</sup>, se identificó como la causa probable de un evento de mortalidad del salmón en jaulas en el Atlántico canadiense. [30]

Por el contrario, se han documentado algunos organismos que son resistentes a los efectos de saxitoxina. Ciertas poblaciones de la almeja softshell (*Mya arenaria*) exhiben una mutación en un residuo de aminoácido que reduce la afinidad de unión de la STX al canal de sodio por unas 1.000 veces, de este modo permitiendo la acumulación de niveles elevados de toxina. Otras especies de bivalvos acumulan altos niveles de toxinas PSP como la almeja mantequilla de Alaska (*Saxidomus giganteus*), aunque el mecanismo de resistencia sigue siendo desconocido. Curiosamente, las nutrias de mar (*lutris*) endémicas de esta región parecen capaces de detectar y evitar la ingestión de estas almejas altamente tóxicas, que a su vez limita la distribución de la nutria de la costa exterior de Alaska donde *S. giganteus* no es tóxico. [46]



## 4.3 Canales iónicos

### 4.3.1 Canales de sodio dependientes de voltaje

En el sistema nervioso se tienen dos tipos de canales iónicos que juegan un papel clave en la transmisión y la integración de las señales: los canales iónicos dependientes de voltaje, se abren en respuesta a los cambios en el voltaje o la distribución de las cargas a través de la membrana celular; y los canales iónicos activados por ligandos, que responden a moléculas específicas como los neurotransmisores acetilcolina, glutamato y otros. Los canales iónicos situados en las superficies celulares son fácilmente accesibles para la interacción con moléculas extracelulares incluyendo drogas y toxinas.

Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSCs) juegan un papel central en la generación y propagación de los potenciales de acción en las neuronas y otras células excitables y son el blanco de los anestésicos locales de uso común, antiarrítmicos y anticonvulsivos. Ellos también son objetivos comunes de neurotoxinas que incluyen toxinas de algas. [71]

Son proteínas transmembrana las cuales forman canales iónicos, después de su activación conducen iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) a través de la membrana plasmática de la célula. Los VGSCs son responsables de la fase ascendente del potencial de acción en las neuronas, miocitos, y otras células excitables y juegan un papel clave en muchos procesos electrofisiológicos [71]. Los VGSCs consisten en una subunidad  $\alpha$  (220-260 kDa) que forma el núcleo de conducción de iones y una o más subunidades beta auxiliares (30-40 kDa) [71]. La subunidad  $\alpha$  consta de cuatro dominios transmembrana homólogos pero no idénticos de acceso abierto (I a IV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6) y un segmento que penetra la membrana corta entre los segmentos S5 y S6. (Figura 3) [71] La subunidad  $\alpha$  contiene estructuras funcionales del poro central (S5 y S6), filtro de selectividad de iones y los sensores de tensión (S1 a S4). [8] El segmento S4 contiene segmentos análogos y repetidos en el que un residuo de lisina o arginina es seguido por dos aminoácidos hidrófobos. [71] Las cargas positivas en los residuos de lisina o de arginina, se llaman cargas de apertura, al moverse a través del campo eléctrico, cuando potencial de membrana cambia, dan como resultado cambios conformacionales y apertura del poro central. La compuerta de inactivación contiene tres residuos de aminoácidos hidrofóbicos

Ile-Phe-Met (IFM) y está formado por un enlazador intracelular entre los dominios transmembrana III y IV. Después del movimiento de los sensores de tensión, la compuerta de inactivación se conecta el poro y evita aún más el flujo de Na<sup>+</sup> a través del canal. [71]

### **4.3.2 Farmacología molecular del canal de sodio**

Los canales de sodio, tienen sitios receptores específicos en las subunidades  $\alpha$  para todos los agentes farmacológicos que actúan sobre ellos. Se han identificado al menos seis sitios  $\alpha$  receptores distintos para neurotoxinas y un sitio receptor para anestésicos locales y fármacos relacionados. [71] Los bloqueadores de poros no peptídico (tetrodotoxina y saxitoxina) y el bloqueador de poro péptido ( $\mu$ -conotoxina) se unen al sitio 1 del  $\alpha$  receptor, [1], [6], [12] para estas toxinas los sitios receptores de las subunidades  $\alpha$  están formados por residuos de aminoácidos en los bucles ubicados en el extremo exterior, inmediatamente en el lado extracelular del poro. El grupo de toxinas liposolubles se una el sitio 2 del  $\alpha$  receptor, incluyendo batracotoxina, veratridina, aconitina, y grayanotoxina, que mejoran la activación de los canales de sodio. Estudios de etiquetado de fotoafinidad y la mutagénesis implican los segmentos transmembrana IS6 y IVS6 del  $\alpha$  receptor en el sitio al cual se une la batracotoxina [3]. El sitio 3-4 del receptor presenta alta afinidad para la neurotoxinas peptídicas que comprenden las toxinas  $\alpha$ -escorpión y las toxinas de la anémona de mar, que ralentizan el acoplamiento de la activación de los canales de sodio a la inactivación. Estas neurotoxinas peptídicas se unen a un sitio receptor complejo que incluye el bucle S3-S4 en el extremo exterior del segmento S4 en el dominio IV. [3] El sitio del receptor para las toxinas de escorpión- $\beta$  incluye el bucle S3-S4 en el extremo extracelular de los segmentos S4 de detección de voltaje en el dominio II. Las toxinas poliéter complejas tales como brevetoxina y ciguatoxina se une el S5. [3]

Por último, los anestésicos locales y fármacos antiepilépticos y antiarrítmicos relacionados se unen a sitios receptores solapantes situados en la cavidad interior del poro del canal de sodio. [1] Los residuos de aminoácidos en los segmentos S6 de por lo menos tres de los cuatro dominios contribuyen a este sitio del receptor de drogas, con el segmento IVS6 jugando el papel dominante.

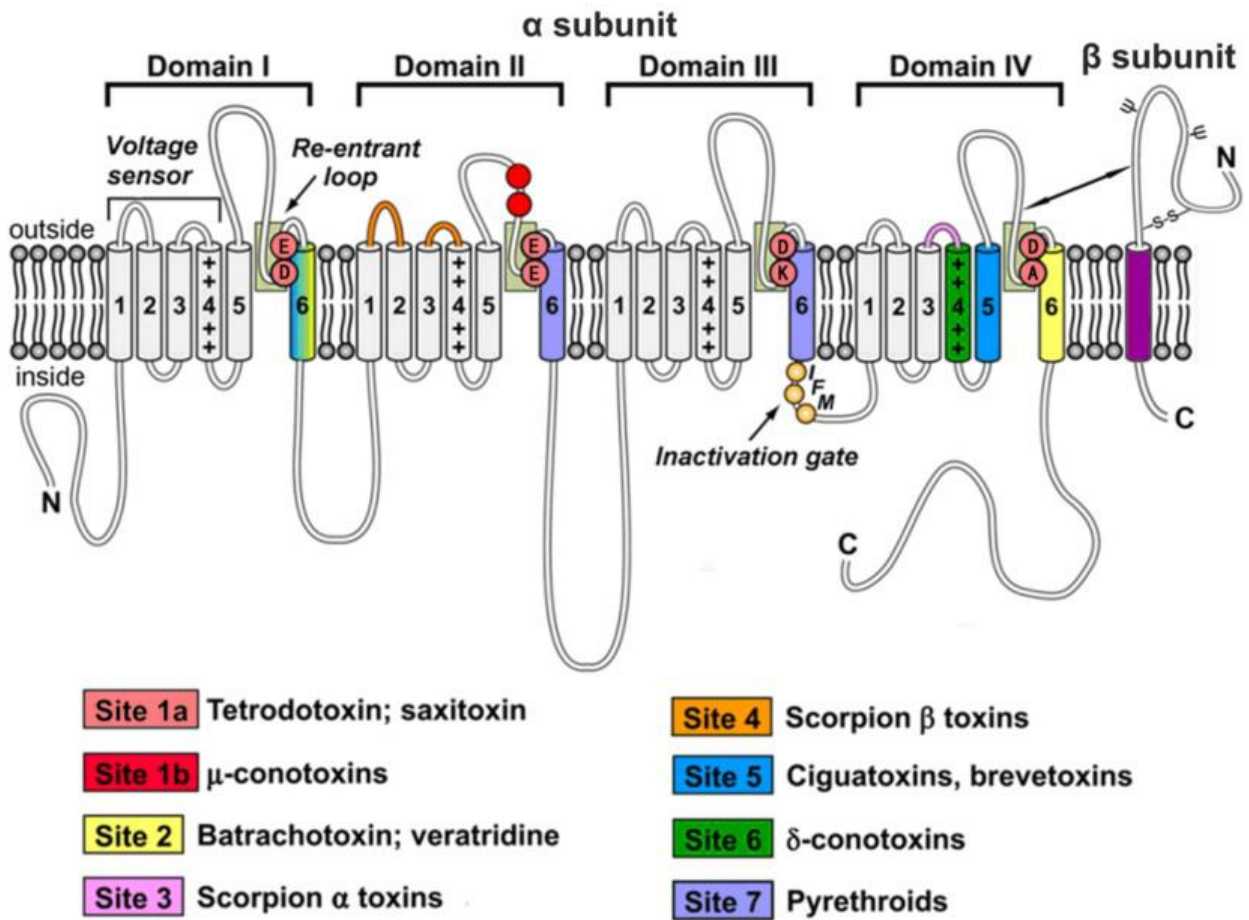


Figura 3. Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje y sitios de bloqueo de diferentes neurotoxina. [71]

#### 4.4 Métodos de detección

Numerosas investigaciones han descrito los métodos de detección de toxinas, se incluyen los enfoques analíticos *in vivo* e *in vitro*. [26], [39], [42] Independientemente de la toxina que se desea determinar, existe una fuerte tendencia a alejarse del uso de bioensayo en animales vivos para pruebas de las toxinas debido a consideraciones tanto éticas como de rendimiento. [51]

Por otra parte, la cuestión de los factores de equivalencia de toxicidad en el desarrollo de métodos alternativos sigue siendo un problema que debe ser abordado desde una perspectiva regulatoria. [52]

#### **4.4.1 Métodos analíticos**

Los enfoques analíticos primarios desarrollados para la determinación de las toxinas PSP son los basados en la cromatografía líquida (LC), con detección en fluorescencia (FLD) o espectrometría de masas (MS). Y por Electroforesis capilar acoplado a luz ultravioleta o acoplado a MS, pero muestran poca sensibilidad debido a los volúmenes muy pequeños de muestra utilizados. [53], [54] Dada la ausencia de cromóforos, las toxinas PSP se convierten en derivados fluorescentes a través de la oxidación, ya sea antes (pre-columna) o después (post-columna) por separación con LC. [53], [54] Ambos enfoques ofrecen una buena sensibilidad con detección basada en fluorescencia, y ambos métodos han sido validados en ensayos en colaboración con la AOAC (AOAC Método Oficial de Análisis 2005.06 y 2011.02) y se aceptan como una alternativa al bioensayo en ratones (AOAC 959.08) para uso regulatorio. Se han desarrollado varios métodos de acoplamiento de LC con espectrometría de masas, con los enfoques más exitosos se han adoptado la cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC), que proporciona un medio eficaz para la separación de compuestos polares como las toxinas PSP. [55] Sin embargo, los límites de detección de Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) son relativamente altos para estas toxinas y tal método aún no se ha validado en un estudio entre laboratorios. [53], [55]

#### **4.4.2 Bioensayo**

Se han usado una variedad de bioensayos in vivo e in vitro para detectar toxinas PSP. El bioensayo en ratón es un ensayo in vivo que ha servido como único método de regulación por la AOAC en todo el mundo, hasta la reciente validación de una técnica de HPLC-FLD, como se señaló anteriormente. [56]

Los métodos *in vitro* incluyen varios tipos y se han adoptado para los métodos basados en anticuerpos, incluyendo, los dispositivos simples y rápidos de flujo lateral (LFD), [57] ELISA placas estándar de múltiples pocillos, [58] y las plataformas de resonancia de plasmones de superficie. [59] El LFD es una prueba cualitativa desarrollada por Jellett Rapid Testing Ltd. que ha sido aprobado en los EE.UU. por la Comisión Interestatal de Saneamiento de Mariscos y la Administración de Alimentos y Medicamentos como método de cribado (límite de detección aproximado de 40 µgSTX eq. por 100 g de muestra). El enfoque basado en célula primaria emplea células de neuroblastoma N2A que han sido tratados previamente con ouabaína (inhibe la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y esta acción directa es la responsable de su efecto inotrópico) y veratridina (activador de los canales de sodio) para mejorar la especificidad del ensayo. [60]

El método basado en el receptor/radioligando, es un ensayo de unión competitiva en la que la STX radiomarcada (tritiada) y la toxina no marcada compiten por los sitios de unión del canal de sodio en una preparación de membrana en bruto de cerebro de rata, que se ha adaptado a un formato de alto rendimiento, de placas de microtitulación, [61], [62] este ensayo de unión al receptor se adoptó recientemente como Método Oficial de Primera Acción por el AOAC 2011.27. [63]

#### **4.5 Ensayo receptor ligando (RBA) para toxinas de algas**

El ensayo receptor ligando (RBA) es un bioensayo funcional, desarrollado para una gran variedad de toxinas marinas incluyendo saxitoxinas (STX), ciguatoxinas (CTXS), brevetoxinas (PbTxS), y el ácido domoico (DA). Este método es específico y sensible, se ha optimizado en un formato de alto rendimiento y se utiliza como un control o una predicción de toxicidad marina, [64-66] así como una herramienta de diagnóstico en un gran número de laboratorios de investigación en todo el mundo. Además, en la última década la tecnología RBA se ha transferido y aplicado a través de proyectos de cooperación técnica del OIEA a los países en desarrollo de Asia Pacífico, África y regiones de América Latina. [67]

El RBA es un excelente candidato para el cumplimiento de los requisitos de alto rendimiento en el análisis cuantitativo, que informa de la potencia tóxica de la muestra. El método se basa en la interacción específica entre las toxinas y su receptor específico, es decir, los canales de sodio dependientes de voltaje, sitio-1 para el envenenamiento por las toxinas paralizantes de molusco (STX), sitio-5 para envenenamiento de Mariscos por neurotóxicas (PbTx) y toxinas de ciguatera (CTXs), y el receptor de glutamato para envenenamiento de toxinas amnésicas de mariscos (DA).

Todos los congéneres de la toxina (ver Tabla 1) se unen con afinidad variable, por lo tanto; el receptor para el RBA se puede utilizar para medir la toxicidad combinada en una muestra, independientemente de los congéneres de toxina particulares presentes. En el ensayo, una toxina radiomarcada compite con las moléculas no marcadas de muestra analizada, para un número finito de sitios receptores disponibles. Cuando se alcanza el equilibrio de unión, la toxina marcada con tritio libre se eliminan por filtración y el resto queda enlazado al receptor es cuantificado por centelleo líquido (LSC).

La reducción de la unión de la toxina es directamente proporcional a la cantidad de toxina no marcada, presente en la muestra. Una curva estándar se genera utilizando concentraciones crecientes de solución estándar de la toxina y la concentración de la toxina en las muestras se determina en referencia a la curva estándar. El ensayo de PSP que se emplea en los Programas de Cooperación Técnica del OIEA ha sido adoptada por la AOAC como método oficial de análisis, OMA-2011.27, tras un estudio de colaboración internacional del funcionamiento del método y es una modificación del método de Doucette et al. [61], [63] En cada caso, un formato de 96 pocillos de placas de microtitulación se utiliza para minimizar el error mediante la reducción de etapas de manipulación de la muestra y de pipeteo. El uso del formato de placa de microtitulación, en conjunción con recuento de centelleo de microplacas, hace que el ensayo sea potencialmente adecuado para su uso en un entorno normativo de alto rendimiento. El RBA potencialmente se puede aplicar a una variedad de matrices: las muestras de algas, fluidos tales como orina, sangre o suero, contenido estomacal, heces o tejidos tales como el hígado y los músculos son los más comúnmente utilizados.

### **4.5.1 Principio del ensayo receptor ligando**

Los receptores son proteínas (macromoléculas biológicas) que se encuentran en las membranas plasmáticas, que están implicados en la recepción de señales directamente desde fuera de la célula o desde dentro de la célula. Estos receptores juegan un papel crítico en la regulación de la actividad celular por moléculas específicas (ligandos) tales como hormonas, neurotransmisores y otros moduladores incluyendo toxinas. La interacción de ligandos con un receptor puede influir en la actividad celular a través de un cambio en la permeabilidad de la membrana, un cambio en la actividad de la enzima o una alteración en la transcripción de genes.

Muchas toxinas se dirigen a los canales iónicos y aquellas provenientes de algas marinas, son las que interfieren con la función fisiológica de los canales de sodio dependientes de voltaje. Por ejemplo, saxitoxinas, tetrodotoxinas, y  $\mu$ -conotoxinas interactúan con el mismo sitio-1 en la molécula y bloquean el poro del canal de sodio, lo que dificulta el flujo de iones. Por lo tanto, la tetrodotoxina radiomarcada y  $\mu$ -conotoxinas se pueden utilizar como alternativa a la saxitoxina en los ensayos de radioligandos de unión al receptor (RBA). Del mismo modo, la brevetoxina se ha utilizado como un ligando para detectar la presencia de ciguatoxina por RBA porque ambas toxinas se unen al sitio-5 de los canales de sodio dependientes de voltaje. [5]

### **4.6 Validación del método**

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los que diseña o desarrolla, los normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los normalizados, para confirmar que son aptos para el fin previsto. [73]

La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los

resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto. [73]

La validación puede incluir los procedimientos para el muestreo, la manipulación y el transporte.

Es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método:

- Calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;
- Comparación con resultados obtenidos con otros métodos;
- Comparaciones interlaboratorios;
- Evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;

Evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica.

Cuando se introduzca algún cambio en los métodos no normalizados validados, es conveniente que se documente la influencia de dichos cambios y, si correspondiera, se realice una nueva validación. [73]

La gama y la exactitud de los valores que se obtienen empleando métodos validados (por ejemplo, la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, precisión, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo) tal como fueron fijadas para el uso previsto, deben responder a las necesidades de los clientes. [73]

La validación incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una verificación de que los requisitos pueden satisfacerse utilizando el método, y una declaración sobre la validez.

A medida que se desarrolla el método, es conveniente realizar revisiones periódicas para verificar que se siguen satisfaciendo las necesidades del cliente. Es conveniente que todo



cambio en los requisitos que requiera modificaciones en el plan de desarrollo sea aprobado y autorizado.

La validación es siempre un equilibrio entre los costos, los riesgos y las posibilidades técnicas. Existen muchos casos en los que la gama y la incertidumbre de los valores (por ejemplo, la exactitud, el límite de detección, la selectividad, la linealidad, la precisión, la robustez y la sensibilidad cruzada) sólo pueden ser dadas en una forma simplificada debido a la falta de información. [73]

## **4.6.1 Algunos de los parámetros para la validación**

### **4.6.1.1 Linealidad**

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito; generalmente se halla la recta de regresión por el método de ajuste de los " mínimos cuadrados". [68]

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre cantidad o concentración de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona, además, con la sensibilidad de calibrado o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito. [68]  
[69]

La recta de linealidad es del tipo:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Siendo "x" la cantidad o concentración, "y" la respuesta, "b" el valor de la pendiente y "a" el valor de la ordenada en el origen. [68]

La media de los valores de x se designa por  $\bar{x}$  y la media de los valores de y por  $\bar{y}$ : la posición de  $(\bar{x}, \bar{y})$  se conoce como el "centro de gravedad" de todos los puntos. [68]

Para representar lo eficiente con que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto denotado por  $r$ . [68]

El valor de  $r$  viene dado por:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2)$$

Cuando no existe correlación entre  $x$  e  $y$ ,  $r$  es igual a 0. Si  $r$  es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada.

### **Determinación de datos anómalos:**

Es muy frecuente encontrarse con la situación en que uno (o posiblemente más) de los resultados que se obtienen de un conjunto de medidas difiera del resto de forma inexplicable. Por esa razón estas medidas se denominan resultados anómalos. En algunos casos, un resultado anómalo puede atribuirse a un error humano sin embargo, incluso cuando los datos que son obviamente erróneos hayan sido eliminados o corregidos, todavía quedan datos que pudieran ser anómalos. La discusión sobre la precisión y la exactitud de un método depende de los valores finales de la media y desviación estándar y tiene que quedar claro que los datos anómalos han sido rechazados o no.

El contraste de Dixon (a veces llamado contraste  $Q$ ) es un contraste popular para datos anómalos debido a que el cálculo es simple:

➤ Para muestras pequeñas:

Muestras que oscilan entre tamaños de 3 a 7; el contraste evalúa una media sospechosa comparando la diferencia entre ella y la medida más próxima en tamaño con el intervalo de las medidas.

Se calcula el estadístico Q:

$$Q = \frac{|valor\ sospechoso - valor\ cercano|}{(valor\ más\ grande - valor\ más\ pequeño)} \quad (3)$$

Los valores críticos de Q para P=0.05 se encuentra en la tabla del anexo 5. Si el valor de Q calculado supera el valor crítico, se rechaza el valor sospechoso.

El contraste de Grubbs que compara la desviación entre el valor sospechoso y la media muestral, con la desviación estándar de la muestra.

Para el uso del contraste de Grubbs:

$$G = \frac{|valor\ sospechoso - \bar{x}|}{s} \quad (4)$$

Donde s se calcula usando el valor sospechoso

Valores críticos de G para P=0.005 se encuentran en la tabla del anexo 5. si el valor de G calculado supera el valor critico se rechaza la hipótesis de que el dato sospechoso no es anómalo

#### **4.6.1.2 Precisión**

Es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra forma, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. La idea de precisión, en general, viene expresada por la media para el valor central y la desviación estándar para la dispersión de los resultados. [70] [69]

La precisión indica el "más-menos" o grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de trabajo, es decir la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. [70] [69]

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir dos tipos de estudios:

- Repetibilidad: es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo. [70] [69] [68]

La precisión se expresa matemáticamente por la desviación estándar  $s$  o, preferiblemente, por el coeficiente de variación CV (desviación estándar relativa DER). El valor aceptable de precisión de un método depende de la concentración del analito y del número de repeticiones del análisis. [70] [68]

Existen tablas que establecen el CV máximo aceptable de un método analítico en función de los límites de aceptación del resultado y del número de réplicas.

- Reproducibilidad: es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.). Cuando, además, los laboratorios son distintos se habla de precisión interlaboratorios. El término “Reproducibilidad” es utilizado generalmente para referirse a la variación entre laboratorios diferentes, dejando el término “Precisión Intermedia” para referirse a la variación dentro de un mismo laboratorio. [70] [69] [68]

Un ensayo de reproducibilidad debe estudiar las principales condiciones de variabilidad del método analítico: tiempo (diferentes días), analistas e instrumentos. [70] [69] [68]

La reproducibilidad global se determina por el coeficiente de variación. Si se desea estudiar el efecto de cada uno de los tres factores (día, analista, instrumento) por separado, deberá realizarse un análisis de varianza. [69] [68]

En ocasiones se considera suficiente efectuar un ensayo de reproducibilidad teniendo en cuenta únicamente la variable tiempo. En análisis de producto terminado suelen considerarse como buenos, coeficientes de variación inferiores del 4 - 5 % en el ensayo de reproducibilidad. [68]

El análisis de varianza (ANOVA) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. De este modo se puede contrastar si una alteración del factor de control conduce a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos. [68]

### 4.6.1.3 Exactitud

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse. [70] [69] [68]

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que están del valor verdadero.

Podemos tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero. [68] [69]

Estadísticamente suele efectuarse un test de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. [68]

$$t_{exp} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (5)$$

Si  $t_{exp}$  menor que  $t_{\alpha, v}$ , para el riesgo escogido y  $v = n - 1$  grados de libertad, significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes y que el método analítico tiene la exactitud requerida.

Si  $t_{\text{exp}}$  mayor que  $t_{\alpha,v}$ , significa que el método analítico no es exacto y existe un error sistemático, por defecto o por exceso.

Las fórmulas anteriores se pueden utilizar también con porcentajes de recuperación. Basta sustituir el valor  $\bar{x}$  por el porcentaje de recuperación %R, y el valor verdadero  $\mu$  por "100%".

#### **4.6.1.4 Limite de detección**

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis es que son capaces de detectar y determinar cantidades traza de analito. Se ha demostrado la importancia de la determinación de concentraciones muy bajas de muchos materiales, por ejemplo, en muestras biológicas y medioambientales, contribuyendo de esta manera al desarrollo de otras muchas técnicas en las que el mejor criterio de aplicación con éxito es que posean límites de detecciones inferiores. Es pues evidente que los métodos estadísticos resultan importantes para la evaluación y comparación de límites de detección.

En términos generales, el Límite de Detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del "blanco". Esta descripción proporciona al analista un buen margen de libertad para definir la definición exacta de Limite de Detección.

## **V. METODOLOGÍA.**

### **5.1 Delimitación espacial**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Escuela de Química de la Universidad de El Salvador, el Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES) Edificio CENSALUD, 2<sup>do</sup> Nivel, Universidad de El Salvador y el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de El Salvador. (LABTOX-UES)

Se utilizaron los métodos oficiales descritos por la NOAA y se extrapolaron a las muestras de este estudio.

### **5.2 Elaboración de los extractos sinápticos de cerebro de cerdo.**

El método para la preparación de membrana de cerdo fue adaptado del documento oficial IAEA-TEDOC-1729, “Detection of Harmful Algal Toxins Using the Radioligand Receptor Binding Assay – A Manual of Methods” apartado 3, sección 3.1 el cual se detalla en el anexo 1. Los cerebros de cerdo fueron proporcionados por el restaurante “La Bodeguita del Cerdo” la cual cuenta con su propia granja de cerdos, donde se controla la raza, la edad y el peso del animal.

Se tomó un cerebro de cerdo entero, colocándolo en un mortero, triturándolo inmediatamente, hasta que se obtuvo una pasta homogénea, de la cual, se tomaron dos muestras (de alrededor de 2 gramos) cada una suspendiéndola en 12.5 mL de disolución amortiguadora, que contiene MOPS/Cloruro de colina/PMSF, manteniendo la suspensión a pH 7.4. Se homogeneizaron a 385 rpm en baño de hielo, utilizando un homogeneizador teflón/vidrio.

Se centrifugó a 20,000 x g por 15 minutos a 4°C en una centrifuga TOMY MX-307 High speed Refrigerated Micro Centrifuge. Por decantación se eliminó el sobrenadante y el sólido restante fue resuspendido en 10 mL de disolución amortiguadora, se homogeneizó por vortex, se tomaron alícuotas de 1 mL las cuales fueron almacenadas en crioviales para su posterior análisis.

Se trabajaron 4 cerebros más siguiendo el procedimiento descrito anteriormente obteniendo un total de 100 extractos sinápticos de cerebro de cerdo de 1 mL.

Todo el procedimiento se llevó a cabo controlando la temperatura a 4 °C para no desnaturalizar la proteína. La proteína extraída se conservó a -80°C.

### 5.3 Determinación del contenido proteico.

Se utilizó la metodología detallada en el kit “Pierce BCA Protein Assay” de Thermo Scientific, PI-23225 tube method el cual se detalla en el Anexo 2.

Se preparó una curva de calibración, utilizando proteína de albúmina estándar. (BSA) Como se muestra en la Tabla 2, se realizaron 6 diluciones de mayor a menor concentración con un rango de trabajo comprendido entre 1500 µg/mL y 125 µg/mL.

Tabla 2. Preparación de disoluciones estándar para la curva de calibración.

Vial	Volumen de diluyente MOPS (µL)	Volumen y fuente estándar de BSA (µL)	Concentración final de BSA (µg/mL)
A	125	375 de estándar	1500
B	325	325 de estándar	1000
C	175	175 de la disolución A	750
D	325	325 de la disolución B	500
E	325	325 de la disolución D	250
F	325	325 de la disolución E	125

Se preparó la disolución de trabajo, mezclando 1 parte de reactivo B (sulfato de cobre al 4%) y 50 partes de reactivo A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%, NaHCO<sub>3</sub> al 0.95%, BCA al 1%, Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> al 0.16%, NaOH al 0.4%, ajustar a pH 11.25 con NaOH).

Se agregaron 0.15 mL de cada vial previamente preparado con el estándar de BSA a 3 mL del reactivo de trabajo. Se incubaron a 37°C por 30 minutos y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en el espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec uv/vis spectrophotometer Shimadzu.



Este ensayo tiene como principio la reacción del ácido bicinconínico, en la forma de su sal de sodio, la cual es un compuesto soluble en agua, altamente sensible y específico para el ion  $\text{Cu}^+$ , se ha reportado que la estructura molecular de la proteína y cuatro péptidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color en muestras de proteína cuando son ensayadas con BCA. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos

Se dividió el cerebro homogeneizado en dos partes iguales y de cada parte se tomó al azar dos muestras que se colocaron en crioviales de 1 mL, para cada muestra se establecieron tres diluciones: de 10 a 100; de 100 a 1000; y de 200 a 1000. Se realizaron estas diluciones en tubos de ensayo disolviendo con la disolución amortiguadora MOPS/Cloruro de Colina/PMSF; tomando 10 muestras: 2 por cada cerebro y almacenando en refrigeración las 10 restantes.

Se tomaron 0.15 mL de cada dilución, se agregaron a 3 mL de disolución de trabajo. Se incubaron por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y se determinaron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm.

La figura 4 muestra la reacción química que se lleva a cabo en el ensayo del ácido BCA

Figura 4. Reacción del BCA

#### 5.4 Efectividad de la proteína como receptor.

Para la determinación de la efectividad de la proteína como receptor se utilizó el método oficial “Receptor Binding Assay Procedure” sección 4.3 del TECDOC-1729; el cual se detalla en el Anexo 3.

Se realizó una curva de calibración estándar de STX no marcada, partiendo de una concentración inicial de STX de  $2.688 \times 10^{-4} \text{M}$  para la cual se realizaron una serie de diluciones utilizando como diluyente HCl 0.003 M, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Curva de calibración de saxitoxina estándar no marcado

<b>Tubo de dilución</b>	<b>Volumen de diluyente (mL)</b>	<b>Volumen de toxina (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentración (M)</b>	<b>Concentración en el ensayo (M)</b>
<b>A</b>	4.38	100 de estándar	$6 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
<b>B</b>	4.5	500 de A	$6 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7}$
<b>C</b>	3.5	1500 de B	$1.8 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-8}$
<b>D</b>	4.5	500 de B	$6 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$
<b>E</b>	4.5	500 de C	$1.8 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-9}$
<b>F</b>	4.5	500 de D	$6 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$
<b>G</b>	4.5	500 de F	$6 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-10}$
<b>H</b>	5	0	0	0

Posteriormente estas diluciones se agregaron a una placa de 96 pocillos la cual fue previamente humedecida con 35  $\mu\text{L}$  de disolución amortiguadora de MOPS/Cloruro de colina.

Se agregaron 35  $\mu\text{L}$  de STX marcada con tritio y por último se agregaron 105  $\mu\text{L}$  de extracto sináptico.

Se incubó por 60 min, para que se llevase a cabo la reacción de competencia por los sitios activos del receptor, entre la STX estándar y la STX marcada con tritio.

Se filtró al vacío para eliminar las toxinas marcadas y no marcadas que no se enlazaron con el receptor; se agregó 50  $\mu\text{L}$  de líquido centellante (optiface), el cual al estar en contacto con la STX marcada, emite un haz de luz el cual se leyó en el contador de centelleo líquido Microbeta Triux, en él se aprovecha el hecho de que la radiación  $\beta$  produce pequeños destellos luminosos en ciertos líquidos orgánicos. Esta luz se recoge y transforma en un pulso eléctrico. El proceso de luminiscencia, o sea la absorción de radiación y la posterior emisión de luz, es muy rápido, disminuyendo el tiempo muerto.

El material que produce el destello se llama cristal de centelleo. Se selecciona para que tenga una alta eficiencia en absorber radiación ionizante y emitir luz (luminiscencia). Debe ser transparente para poder transmitir la luz producida, y debe estar a oscuras para que la luz ambiental no le afecte. El material más empleado son los cristal de centelleo, en ciertas aplicaciones son útiles también los líquidos orgánicos.

Tomando como referencia el procedimiento descrito anteriormente, se realizaron dos ensayos:

- El primero, utilizando reactivos y extracto sináptico estándar. Se determinó la concentración total de dos muestras desconocidas, con dos diluciones diferentes para cada muestra y se leyó por triplicado. Cada triplicado se repitió 7 veces.
- El segundo, con la modificación, que se reemplazó el extracto sináptico estándar, por el extracto sináptico de cerdo que se obtuvo en el apartado 4.2. y de la misma manera se determinaron las concentraciones de las dos muestras desconocidas.

Para evaluar la efectividad de la proteína de cerebro de cerdo local como receptor, se realizó una intercomparación de las curvas de calibración descritas anteriormente y se estimó el valor del LOD para ambas curvas.

## **5.5 Extracción de saxitoxina de muestras de ostras.**

Para la extracción de la toxina se tomó como referencia el método descrito en la sección 4.2 del IAEA-TEDOC-1729, “Detection of Harmful Algal Toxins Using the Radioligand Receptor Binding Assay – A Manual of Methods, (anexo 3).

A continuación se resume la marcha:

- 1) Se tomó el tejido de 7 ostras y se trituraron en una licuadora.
- 2) Se tomaron 100 gramos del tejido triturado, a los cuales se le agregó 100mL de ácido clorhídrico 0.1N.
- 3) Se mezcló por vortex y se ajustó el pH a 3.5.
- 4) Se calentó la mezcla hasta punto de ebullición durante 5 minutos, luego se enfrió y se ajustó nuevamente el pH.
- 5) Posteriormente se llevó a un volumen final de 200mL y se dejó en reposo para lograr la separación de las capas, se tomó 15 mL de sobrenadante y se centrifugó a 3000 xg durante 15 minutos.
- 6) Se filtró utilizando una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro, se almacenó los extractos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizados para el ensayo receptor ligando.

## **5.6 Validación del ensayo receptor ligando para moluscos bivalvos.**

Se realizó la validación del método descrito en la sección 4.3 del TECDOC-1729, (Anexo 4) con la modificación que se utilizó extracto de cerebro de cerdo producido de forma local como receptor; se cumplieron los parámetros establecidos por el documento “G9.6 Validación de métodos fisicoquímicos” del Organismo Salvadoreño de Acreditación, OSA.

Los parámetros que se utilizaron para validar el ensayo receptor ligando para muestras de ostras, fueron:

### ➤ Linealidad

Se realizaron dos curvas de calibración, la primera con STX y extracto proteico estándar, la segunda con STX estándar y extracto proteico obtenido en el apartado 4.2 de esta investigación.

Para el desarrollo de las curvas se utilizaron dos placas de 96 pocillos, para cada curva se realizó el ensayo en diferentes tiempos, con una semana de diferencia, con las curvas

obtenidas se determinó la concentración de toxina en las muestras de ostras desconocidas, mediante el método de extrapolación del valor de cuentas por minuto de dichas muestras.

Se graficó, determinando la ecuación de la curva utilizando el software Graph Pad Software inc.

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(x - \log EC_{50}) \text{pendiente}}} \quad (6)$$

➤ Limite de detección.

Se determinó el LOD usando una matriz matemática en Excel, el cual nos proporcionó el límite cuantificable para cada una de las curvas de calibración realizadas.

La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$LOD = \left[ \left( \frac{EC_{80}}{100 - EC_{80}} \right)^{\left( \frac{1}{\text{pendiente}} \right)} \right] EC_{50} \quad (7)$$

Donde:  $EC_{50}$  es la concentración efectiva al 50%, también conocida como  $IC_{50}$  concentración inhibitoria al 50%;  $EC_{80}$  es el punto de inflexión donde se pierde la linealidad; pendiente de la curva. [63]

➤ Precisión y exactitud

Para una muestra se realizaron dos diluciones las cuales se analizaron por triplicado, cada análisis por triplicado se repitió siete veces. Se analizaron las variaciones entre las muestras y los triplicados utilizando la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (8)$$

Donde: S es la desviación estándar;  $X_i$  es un valor entre (0, n);  $\bar{X}$  es el promedio de los datos; n es el número de muestras

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (9)$$

Donde: %CV es el porcentaje de coeficiente de variación; S es la desviación estándar;  $\bar{X}$  es el promedio de los datos.

La tabla 4 muestra los criterios de aceptación para los parámetros de validación desarrollados en esta investigación.

Tabla 4. Criterios de aceptación para los parámetros de validación

<b>Parámetro</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>Linealidad</b>	$r^2 \geq 0.98$
<b>Precisión</b>	El coeficiente de variación no debe superar 7.3%
<b>LOD</b>	Valor regulatorio 800 $\mu\text{g/Kg}$

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en las cuatro etapas principales, las cuales fueron:

- Elaboración de los extractos sinápticos de cerebro de cerdo
- Determinación del contenido proteico.
- Determinación de la efectividad de la proteína como receptor
- Validación del ensayo receptor ligando para moluscos bivalvos.

### 6.1 Elaboración de los extractos sinápticos de cerebro de cerdo.

La materia prima (cerebro de cerdo) utilizada para la elaboración de dichos extractos, fue colectada con el apoyo del Ing. Daniel Vásquez, quien nos proporcionó información sobre los cerdos, edad promedio 22 semanas, peso promedio 250- 300 lb y raza Large white.

Tomando como referencia el procedimiento descrito en el apartado 5.2 de la metodología de investigación. Se tomaron 5 cerebros, a los cuales se realizó el procedimiento de extracción por separado, en la tabla 5 se reporta el peso de cada muestra, la cantidad de disolución amortiguadora agregada y la dilución final a la cual fueron almacenadas.

Tabla 5. Peso de las muestras de extracto sináptico, los cerebros fueron codificados de la CA-CE. M1 y M2 representa el duplicado tomado de cada cerebro. (Amortiguador: MOPS/Cloruro de colina/PMSF)

Cerebro	Peso de muestra (g)	Disolución amortiguadora (mL)	Dilución final para almacenaje* (mL)
CAM1	2.105	12.5	10
CAM2	2.007	12.5	10
CBM1	2.018	12.5	10
CBM2	2.017	12.5	10
CCM1	2.076	12.5	10
CCM2	2.085	12.5	10
CDM1	2.005	12.5	10
CDM2	2.003	12.5	10
CEM1	2.019	12.5	10
CEM2	2.008	12.5	10

\*La dilución final se dividió en alícuotas de 1 mL para su almacenaje.

## 6.2 Determinación del contenido proteico.

### 6.2.1 Elaboración de la curva de calibración para la determinación del contenido proteico.

Para la determinación del contenido proteico en las muestras de extracto sináptico preparado localmente, se desarrolló el procedimiento descrito en el apartado 5.3 de la metodología, el cual describe las cantidades de reactivos necesarias para preparar la curva de calibración, también describe las cantidades y procedimiento para la cuantificación de la proteína en dichos extractos sinápticos.

Los valores obtenidos de absorbancia para la curva de calibración se muestran en la tabla 6, dichas lecturas fueron tomadas a un valor de longitud de onda de 562 nm en el espectrofotómetro UV/Vis.

Tabla 6. Valores de absorbancia para la curva de calibración.

Vial	Concentración BSA (µg/mL)	Absorbancia a $\lambda=562$ nm
A	2000	2.165
B	1500	1.694
C	1000	1.205
D	750	0.895
E	500	0.679
F	250	0.367

Los valores de absorbancia obtenidos fueron graficados contra las respectivas concentraciones del estándar de albumina; en la figura 5, se muestra la relación lineal entre ambos. Para dicha curva de calibración se obtuvo la ecuación de linealidad  $y = 0.001x + 0.1447$  y un coeficiente de correlación lineal ( $r$ ) de 0.999, el cual representa un grado aceptable de relación entre las dos variables, por tanto puede ser utilizada dicha ecuación para determinar concentraciones de proteína en muestras desconocidas.



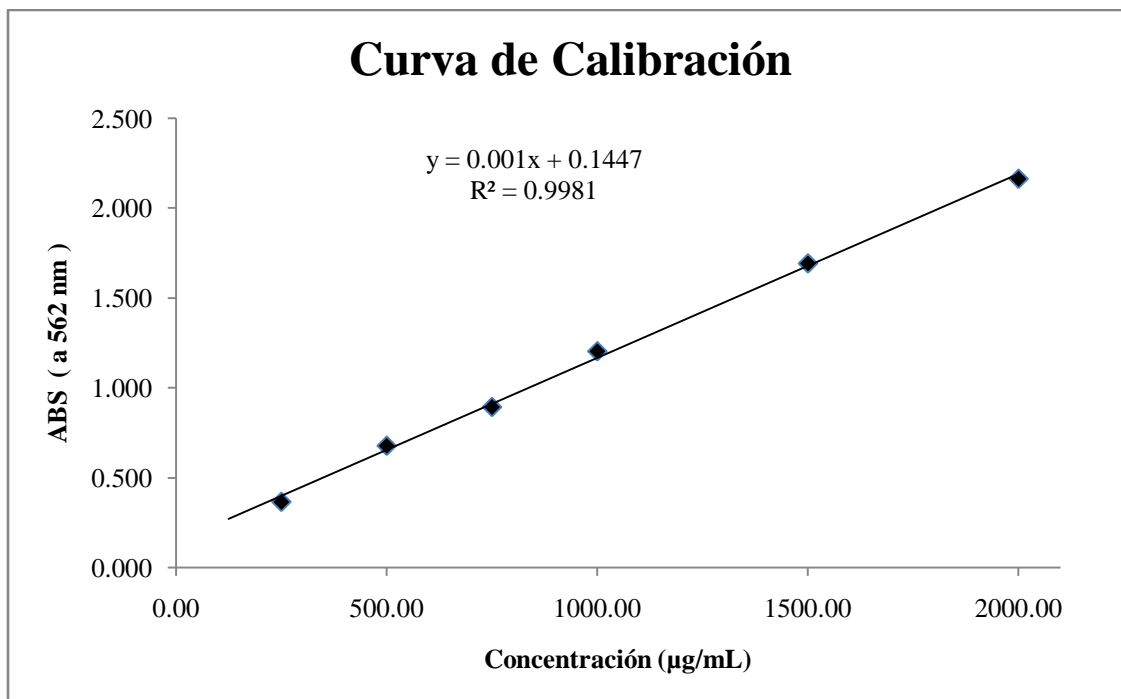


Figura 5. Gráfico ABS vs. Concentración de el estándar de albumina.

### **6.2.2 Determinación del contenido de proteína en muestras de cerebro de cerdo preparado localmente.**

Para la determinación del contenido proteico en los extractos sinápticos de cerebro de cerdo, se seleccionaron 2 crioviales por cada extracto de cerebro (ver sección 5.1) para cada criovial se determinaron 3 diluciones: de 10 a 100; de 100 a 1000; y de 200 a 1000, se desarrolló el procedimiento descrito en el apartado 5.3, finalmente se realizaron las respectivas lecturas de absorbancia, para las cuales se obtuvieron los valores reportados en la tabla 7. Con estos resultados de absorbancia y la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración, se determinó con cual dilución era más favorable realizar el ensayo.

Tabla 7. Factor de dilución aplicada a cada criovial y su respectivo valor de absorbancia.

Absorbancia a $\lambda=562$ nm			
Muestra \ Dilución	10 - 1000	100 - 1000	200 - 1000
CAM1	0.144	0.395	1.308
CAM2	0.178	0.945	1.519
CBM1	0.283	0.896	1.774
CBM2	0.281	0.968	1.762
CCM1	0.291	1.13	1.718
CCM2	0.318	1.189	1.741
CDM1	0.311	1.12	1.67
CDM2	0.292	1.192	1.755
CEM1	0.293	1.208	1.927
CEM2	0.277	1.023	1.9

Se aplicó la ecuación de la curva de calibración  $y=0.001x + 0.1447$  para determinar la concentración en las muestras de cerebro de cerdo utilizando los resultados de absorbancia de la tabla 7. A continuación se presenta un ejemplo de los cálculos realizados para determinar la concentración de proteína para la muestra CAM1.

Cálculo para dilución 100 a 1000 de CAM1, siendo  $y$  la absorbancia igual a 0.395:

Ecuación de la regresión lineal  $y = 0.001x + 0.1447$

Despejando para  $x$   $x = \frac{y-0.1447}{0.001}$

Sustituyendo  $y$   $x = \frac{0.395-0.1447}{0.001}$

Concentración CAM1 =  $250.3 \mu g/mL$

El cálculo desarrollado anteriormente fue aplicado a cada muestra de cerebro, dando como resultado los valores de concentración que se presentan en la tabla 8, dichos valores de concentración deberán de corregirse por efecto de dilución.

Tabla 8. Determinación de concentración de proteína en extractos sinápticos de cerebro de cerdo.

		Concentración (µg/mL)		
Muestra	Dilución	10 - 1000	100 - 1000	200 - 1000
	CAM1		0.7	250.3
CAM2		33.3	800.3	1374.3
CBM1		138.3	751.3	1629.3
CBM2		136.3	823.3	1617.3
CCM1		146.3	985.3	1573.3
CCM2		173.3	1044.3	1596.3
CDM1		166.3	975.3	1525.3
CDM2		147.3	1047.3	1610.3
CEM1		148.3	1063.3	1782.3
CEM2		132.3	878.3	1755.3

Cada una de las concentraciones anteriores se corrigió por el factor de dilución y se hizo una conversión de unidades a mg/mL, los resultados obtenidos para estos cálculos se presentan en la tabla 9.

Corrección del factor de dilución para CAM1:

Se multiplica por 10 que es el factor de dilución de 100 a 1000

$$\text{CAM1} = 250.3 \times 10 = 22503 \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$2503 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} = 2.503\text{mg}/\text{mL}$$

Tabla 9. Valor de concentración final en extractos sinápticos

		<b>Concentración (mg/mL)</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>10 - 1000</b>	<b>100 - 1000</b>	<b>200 - 1000</b>
	<b>CAM1</b>		0.07	2.503
<b>CAM2</b>		3.33	8.003	6.872
<b>CBM1</b>		13.83	7.513	8.147
<b>CBM2</b>		13.63	8.233	8.087
<b>CCM1</b>		14.63	9.853	7.867
<b>CCM2</b>		17.33	10.443	7.982
<b>CDM1</b>		16.63	9.753	7.627
<b>CDM2</b>		14.73	10.473	8.052
<b>CEM1</b>		14.83	10.633	8.912
<b>CEM2</b>		13.23	8.783	8.777

A partir de los resultados de concentración de la Tabla 9, se estableció que la dilución óptima para el ensayo del BCA era de 100 - 1000  $\mu$ L, ya que todos los valores de absorbancia se encuentran dentro del rango de la curva de calibración, esto se comprueba ya que con la dilución de 10 - 100  $\mu$ L se obtienen valores por debajo del rango de concentración y la dilución de 200 - 1000  $\mu$ L presenta valores muy altos.

#### **Comprobación del ensayo del ácido bicinconónico:**

Se realizó la comprobación del ensayo de la proteína tomando al azar 10 crioviales de extracto de cada cerebro, lo cual sumo un total de 50 crioviales de extracto sináptico. Se determinó la absorbancia cuyos valores se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Datos de absorbancia para las muestras con un factor de dilución 100 - 1000  $\mu$ L.

Absorbancia a $\lambda=562$ nm										
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>CAM</b>	1.130	1.177	1.293	1.292	1.254	1.204	1.315	1.189	1.203	1.304
<b>CBM</b>	1.240	1.290	1.410	1.276	1.279	1.290	1.320	1.248	1.279	1.262
<b>CCM</b>	1.178	1.224	1.240	1.260	1.281	1.232	1.220	1.164	1.180	1.212
<b>CDM</b>	1.190	1.222	1.230	1.266	1.258	1.319	1.301	1.471	1.269	1.185
<b>CEM</b>	1.216	1.217	1.195	1.285	1.176	1.208	1.125	1.235	1.156	1.246

Aplicando la ecuación de la curva de calibración y los valores de absorbancia de la tabla anterior se determinó la concentración proteica para cada una de las muestras, dichos resultados se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Concentración de proteína.

Concentración de proteína (mg/mL)										
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>CAM</b>	9.853	10.323	11.483	11.473	11.093	10.593	11.703	10.443	10.583	11.593
<b>CBM</b>	10.953	11.453	12.653	11.313	11.343	11.453	11.753	11.033	11.343	11.173
<b>CCM</b>	10.333	10.793	10.953	11.153	11.363	10.873	10.753	10.193	10.353	10.673
<b>CDM</b>	10.453	10.773	10.853	11.213	11.133	11.743	11.563	13.263	11.243	10.403
<b>CEM</b>	10.713	10.723	10.503	11.403	10.313	10.633	9.803	10.903	10.113	11.013

Para cada una de las muestras de extracto sináptico, se calculó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje coeficiente de variación dichos valores se presentan en la tabla 12. Podemos observar que el %CV es igual a 5% por lo tanto dicho valor representa una aceptable reproducibilidad en los resultados.

Tabla 12. Determinación del coeficiente de variación.

<b>Muestra</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>CAM</b>	10.914	0.637
<b>CBM</b>	11.447	0.480
<b>CCM</b>	10.744	0.371
<b>CDM</b>	11.264	0.826
<b>CEM</b>	10.612	0.459
<b>Promedio total</b>	10.99	<b>0.55</b>
	CV	0.05
	%CV	<b>5.04</b>

### **6.2.3 Determinación del contenido de proteína en muestras de cerebro estándar.**

Para la determinación del contenido proteico en los extractos sinápticos de cerebro de cerdo estándar, se seleccionaron 2 crioviales que contenían 2 mL de extracto sináptico de cerebro. Para cada criovial se establecieron 3 diluciones: de 10 a 100; de 100 a 1000; y de 200 a 1000.

Se tomaron 0.150 mL de cada dilución, se agregaron a 3 ml de disolución de trabajo que contenía una parte de reactivo B y 50 partes de reactivo A. Se incubo por 30 min a 37°C, posteriormente se tomaron las lecturas de absorbancia a  $\lambda=562$  nm, los valores obtenidos se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Factor de dilución aplicada a cada criovial y su respectivo valor de absorbancia.

		Absorbancia a $\lambda=562$ nm		
Muestra	Dilución	10 - 1000	100 - 1000	200 - 1000
	CEM1		0.135	1.056
CEM2		0.158	1.061	1.561
CEM1		0.145	1.057	1.681
CEM2		0.135	1.062	1.571
CEM1		0.139	1.032	1.625
CEM2		0.147	1.025	1.681
CEM1		0.145	1.036	1.790
CEM2		0.104	1.081	1.702
CEM1		0.130	1.048	1.597
CEM2		0.106	1.096	1.710

Se aplicó la ecuación de la curva de calibración  $y=0.001x + 0.1447$  para determinar la concentración en las muestras de cerebro de cerdo utilizando los resultados de absorbancia de la tabla 13. Dichos resultados de concentración se presentan en la tabla 14.

Cálculo para dilución 100 a 1000 de CEM1, siendo  $y$  la absorbancia igual a 1.056:

Ecuación de la regresión lineal  $y = 0.001x + 0.1447$

Despejando para  $x$   $x = \frac{y-0.1447}{0.001}$

Sustituyendo  $y$   $x = \frac{1.056-0.1447}{0.001}$

Concentración  $x = 911.3 \mu g/mL$

Tabla 14. Valores de concentración de proteína en extractos de cerebro de cerdo estándar.

		Concentración (µg/mL)		
Muestra	Dilución	10 - 1000	100 - 1000	200 - 1000
		CAM1	9.7	911.3
	CAM2	13.3	916.3	1416.3
	CBM1	0.3	912.3	1536.3
	CBM2	9.7	917.3	1426.3
	CCM1	5.7	887.3	1480.3
	CCM2	2.3	880.3	1536.3
	CDM1	0.3	891.3	1645.3
	CDM2	40.7	936.3	1557.3
	CEM1	14.7	903.3	1452.3
	CEM2	38.7	951.3	1565.3

Aplicando la corrección del factor de dilución y transformando las unidades a mg/mL se obtuvieron los resultados de la tabla 15.

Corrección de factor de dilución para CAM1:

Se multiplica por 10 que es el factor de dilución de 100 a 1000

$$CAM1 = 911.3 \times 10 = 9113 \mu g/ml$$

$$9113 \frac{\mu g}{mL} \times \frac{1 mg}{1000 \mu g} = 9.113 mg/ml$$



Tabla 15. Valores de concentración final en extractos de cerebro de cerdo estándar.

		<b>Concentración (mg/mL)</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>10 - 1000</b>	<b>100 - 1000</b>	<b>200 - 1000</b>
	<b>CAM1</b>		0.97	9.11
<b>CAM2</b>		1.33	9.16	7.08
<b>CBM1</b>		0.03	9.12	7.68
<b>CBM2</b>		0.97	9.17	7.13
<b>CCM1</b>		0.57	8.87	7.40
<b>CCM2</b>		0.23	8.80	7.68
<b>CDM1</b>		0.03	8.91	8.22
<b>CDM2</b>		4.07	9.36	7.78
<b>CEM1</b>		1.47	9.03	7.26
<b>CEM2</b>		3.87	9.51	7.82

Se estableció a partir de los resultados de concentración de la Tabla 15, que la dilución óptima para el ensayo del BCA era de 100  $\mu$ L a 1000  $\mu$ L, esto se debe a que como se puede observar los valores de absorbancia que se ajustan mejor a la curva de calibración son los que se encuentran en ese factor de dilución.

Se realizó la comprobación del ensayo de la proteína tomando al azar 2 crioviales de extracto estándar sináptico de cerdo, los cuales se dividieron en un total de 10 muestras cada uno. Se midió la absorbancia cuyos valores se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Datos de absorbancia para las muestras a dilución 100 - 1000  $\mu$ L.

		<b>Absorbancia a <math>\lambda=562</math> nm</b>									
<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	
<b>CEM1</b>	1.205	1.225	1.290	1.271	1.318	1.246	1.261	1.235	1.197	1.190	
<b>CEM2</b>	1.252	1.229	1.276	1.170	1.217	1.241	1.235	1.314	1.273	1.235	

Aplicando la ecuación de regresión lineal y los valores de absorbancia reportados en la tabla anterior se determinó la concentración proteica de cada muestra, dichos valores se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 17. Concentración de proteína

<b>Concentración de proteína (mg/mL)</b>										
<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>CEM1</b>	10.603	10.803	11.453	11.263	11.733	11.013	11.163	10.903	10.523	10.453
<b>CEM2</b>	11.073	10.843	11.313	10.253	10.723	10.963	10.903	11.693	11.283	10.903

Para cada una de las muestras de extracto sináptico estándar, se calculó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje coeficiente de variación dichos valores se presentan en la tabla 18. Podemos observar que el %CV es igual a 3.6% por lo tanto dicho valor representa una aceptable reproducibilidad en los resultados.

Tabla 18. Determinación del coeficiente de variación.

<b>Muestra</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>CEM1</b>	10.99	0.41
<b>CEM2</b>	10.99	0.38
<b>Promedio total</b>	10.99	<b>0.40</b>
	CV	0.036
	<b>%CV</b>	<b>3.66</b>

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos para la determinación de contenido proteico para ambos cerebros, se pudo determinar que el extracto preparado localmente poseía una concentración de proteína equivalente a la del extracto estándar.

### 6.3 Determinación de la efectividad de la proteína como receptor

#### 6.3.1 Curva de calibración de STX utilizando extracto sináptico de cerdo estándar como receptor y análisis de muestras desconocidas.

Se realizó la curva de calibración estándar de STX no marcada, se partió de una concentración inicial de STX estándar de  $2.688 \times 10^{-4} \text{M}$  a partir de esta, se realizaron una serie de diluciones utilizando como diluyente HCl 0.003 M, como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Curva de calibración STX no marcada.

Tubo de dilución	Volumen de diluyente (mL)	Volumen de toxina ( $\mu\text{L}$ )	Concentración (M)	Concentración en el ensayo (M)
A	4.38	100 de estándar	$6 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
B	4.5	500 de A	$6 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7}$
C	3.5	1500 de B	$1.8 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-8}$
D	4.5	500 de B	$6 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$
E	4.5	500 de C	$1.8 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-9}$
F	4.5	500 de D	$6 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$
G	4.5	500 de F	$6 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-10}$
H	5	0.000	0.000	0.000

Al igual que la curva de calibración; el patrón de comparación entre ensayos o verificador del control de calidad QC (por sus siglas en inglés Quality Control) que contiene STX al  $1.8 \times 10^{-8} \text{M}$ , se preparó a partir de STX estándar diluyendo con HCl 0.03M.

Se tomó una placa de 96 pocillos; se adicionó 35  $\mu\text{L}$  de disolución amortiguadora a cada pocillo para humedecer el filtro, posteriormente 35  $\mu\text{L}$  de las diluciones de la curva estándar, QC y muestras; cada una por triplicado.

En la tabla 20, se muestra la distribución de la placa; en la cual la curva estándar comprende los pocillos de las columnas 1, 2 y 3; de las filas A-H en un orden descendente en concentración.

El control de calidad QC en las columnas 4, 5 y 6 de la fila A. Se trabajó con dos muestras de extracto sináptico, codificadas como M1D1 y M1D2 las cuales se colocaron de manera que obtuvimos 21 lecturas de cada una.

Tabla 20. Configuración de la placa de 96 pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	QC	QC	QC	M1D2	M1D2	M1D2			
B	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1			
C	$3 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2			
D	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1			
E	$3 \times 10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2			
F	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1			
G	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2			
H	0	0	0	M1D1	M1D1	M1D1						

Se agregaron 35  $\mu$ L de STX marcada con tritio y por último se agregaron 105  $\mu$ L de extracto sináptico.

Se incubó por 60 min, para que se llevase a cabo la reacción de competencia por los sitios activos del receptor, entre la STX estándar y la STX marcada con tritio.

Se filtró al vacío para eliminar las toxinas marcadas y no marcadas que no se enlazaron con el receptor; se agregó 50 µL de optiface como líquido centellante; luego de 60 min de incubación se utilizó un equipo detector de centelleo líquido; los resultados se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados obtenidos de las cuentas por minuto (en rojo la curva de calibración; en verde el QC; en negro las muestras problema).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	63	57	59	586	592	584	564	586	574			
<b>B</b>	130	73	65	541	482	535	572	579	569			
<b>C</b>	140	182	242	574	553	574	594	586	592			
<b>D</b>	236	365	203	530	542	483	590	586	589			
<b>E</b>	419	519	515	537	566	534	586	545	543			
<b>F</b>	647	585	589	562	450	474	582	584	583			
<b>G</b>	643	643	601	581	587	592	566	581	595			
<b>H</b>	556	821	779	518	540	531						

A partir de estos valores de cuentas por minuto (CPM), utilizando una plantilla de Excel se realizó el respectivo tratamiento estadístico, se obtuvo el promedio de las tres réplicas, la desviación estándar (DS) y el porcentaje de coeficiente de variación (%CV) como se muestra en la tabla 22 a y b.

Tabla 22a. Determinación de la desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación para los valores de CPM curva de calibración.

Concentración de estándar (nM)	log de concentración (M)	CPM				S	%CV
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio		
1000	-6	63	57	59	59.7	3	5%
100	-7	130	73	65	89.3	35	40%
30	-7.523	140	182	242	188	51	27%
10	-8	236	365	203	268	86	32%
3	-8.523	419	519	515	484	57	12%
1	-9	647	585	589	607	35	6%
0.1	-10	643	643	601	629	24	4%
0.000001	-15	556	821	779	719	142	20%

Tabla 22b. Determinación de la desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación para los valores de CPM muestras desconocidas.

Diluciones	Código	CPM				S	%CV
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio		
1	QC (3 nM)	586	592	584	587	4	1%
50	M1D1	541	482	535	519	32	6%
200	M1D2	574	553	574	567	12	2%
50	M1D1	530	542	483	518	31	6%
200	M1D2	537	566	534	546	18	3%
50	M1D1	562	450	474	495	59	12%
200	M1D2	581	587	592	587	6	1%
50	M1D1	518	540	531	530	11	2%
200	M1D2	564	586	574	575	11	2%
50	M1D1	572	579	569	573	5	1%
200	M1D2	594	586	592	591	4	1%
50	M1D1	590	586	589	588	2	0%
200	M1D2	586	545	543	558	24	4%
50	M1D1	582	584	583	583	1	0%
200	M1D2	566	581	595	581	15	2%

Todos los resultados, exceptuando el segundo punto de la curva, presentan un %CV menor a 30% por lo cual no fue necesario omitir ningún dato de CPM al momento de graficar.

Para lo cual es necesario transformar las concentraciones de la curva de nM a logaritmos de la concentración, y utilizando el programa GraphPad Prism 6.

La figura 6 muestra el gráfico obtenido a partir del log de la concentración vs las CPM obtenidas; se observa que la curva presenta la forma sigmoidea característica, donde las parte superior representa las uniones de STX marcada en ausencia de STX estándar y en la parte inferior se presentan los enlaces no específicos con alta saturación de STX no marcada, el programa determina el  $EC_{50}$  que representa el punto medio entre la concentración de STX radiomarcada y la STX no marcada por el sitio activo del receptor; a partir de esto se determinó el intervalo de linealidad comprendido entre los puntos  $EC_{20}$  a  $EC_{80}$ .

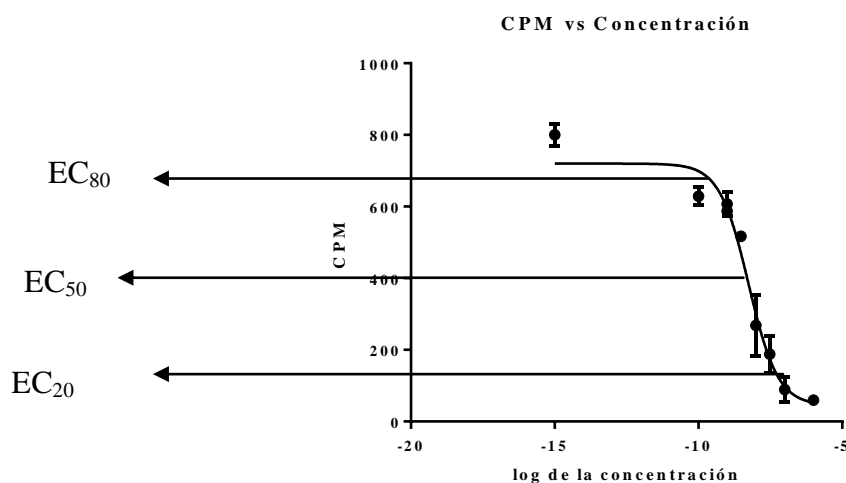


Figura 6. Curva de calibración utilizando como receptor extracto sináptico de cerebro de cerdo estándar.

A partir de la gráfica se determinó la ecuación correspondiente y se determinó el máximo y el mínimo de la curva, además se obtuvo la concentración de STX en los puntos de importancia estadística, estos datos se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: parámetros estadísticos determinados a partir de la curva de calibración.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Mínimo	53.17	EC <sub>20</sub>	2.53x10 <sup>-08</sup> M 25.33 nM
Máximo	710	EC <sub>50</sub>	5.7x10 <sup>-09</sup> M 5.666 nM
LogEC <sub>50</sub>	-8.25	EC <sub>70</sub>	2.27x10 <sup>-09</sup> M 2.269 nM
Pendiente	-0.93	EC <sub>80</sub>	1.27x10 <sup>-09</sup> M 1.267 nM

La tabla 24 presenta los datos de log de concentraciones de las muestras desconocidas, determinadas a partir de la ecuación obtenida de la gráfica, (figura 5) además, se calculó la relación entre el máximo y el mínimo de la curva (B/Bmax) que establece si la concentración se encuentra en parte lineal de la curva, de esta manera se puede concluir si la muestra está muy diluida en el caso que B/Bmax sea mayor a 0.7 y muy concentrada en el caso que sea menor a 0.2.

Tabla 24. Determinación de la concentración de las muestras desconocidas, determinados por extrapolación de la curva estándar.

Logaritmo de concentración (M)			Código de la muestra	Dilución	B/Bmax				B/Bmax rango 0.2 a 0.7
Replica 1	Replica 2	Replica 3			Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	
-8.920	-8.960	-8.910	QC (3 nM)	1	0.811	0.820	0.808	0.813	diluido
-8.744	-8.543	-8.722	M1D1	50	0.743	0.653	0.734	0.710	diluido
-8.877	-8.790	-8.877	M1D2	200	0.793	0.761	0.793	0.782	diluido
-8.704	-8.748	-8.546	M1D1	50	0.726	0.744	0.654	0.708	diluido
-8.729	-8.843	-8.718	M1D2	200	0.737	0.781	0.732	0.750	diluido
-8.826	-8.445	-8.518	M1D1	50	0.775	0.604	0.641	0.673	ok
-8.908	-8.935	-8.959	M1D2	200	0.804	0.813	0.820	0.812	diluido
-8.661	-8.740	-8.707	M1D1	50	0.708	0.741	0.727	0.725	diluido
-8.834	-8.931	-8.877	M1D2	200	0.778	0.811	0.793	0.794	diluido
-8.868	-8.899	-8.855	M1D1	50	0.790	0.801	0.785	0.792	diluido
-8.969	-8.931	-8.959	M1D2	200	0.823	0.811	0.820	0.818	diluido
-8.950	-8.931	-8.945	M1D1	50	0.817	0.811	0.816	0.815	diluido
-8.931	-8.759	-8.751	M1D2	200	0.811	0.749	0.746	0.769	diluido
-8.912	-8.921	-8.917	M1D1	50	0.805	0.808	0.807	0.807	diluido
-8.843	-8.908	-8.974	M1D2	200	0.781	0.804	0.825	0.803	diluido



Se hizo la conversión de unidades, a partir del log de concentración a ng/mL, que es la forma de presentar los resultados según la norma internacional, se calcularon el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación; tanto del QC como de las muestras problemas como se aprecia en la tabla 25.

Tabla 25. Valores finales de coeficiente de variación y concentración de STX en las muestras problema.

Concentración de STX en el ensayo (nM)				S	%CV	STX en el extracto (nM)	STX en el extracto (ng/mL)
Replica 1	Replica 2	Replica 3	promedio				
1.202	1.096	1.230	<b>1.18</b>	0.07	6%	7	<b>3</b>
1.803	2.863	1.897	<b>2.19</b>	0.59	27%	656	<b>244</b>
1.328	1.622	1.328	<b>1.43</b>	0.17	12%	1712	<b>637</b>
1.978	1.787	2.843	<b>2.20</b>	0.56	26%	661	<b>246</b>
1.865	1.437	1.913	<b>1.74</b>	0.26	15%	2086	<b>777</b>
1.492	3.588	3.033	<b>2.71</b>	1.09	40%	812	<b>302</b>
1.236	1.160	1.098	<b>1.17</b>	0.07	6%	1398	<b>521</b>
2.180	1.818	1.962	<b>1.99</b>	0.18	9%	596	<b>222</b>
1.464	1.173	1.328	<b>1.32</b>	0.15	11%	1587	<b>591</b>
1.355	1.262	1.395	<b>1.34</b>	0.07	5%	401	<b>149</b>
1.074	1.173	1.098	<b>1.12</b>	0.05	5%	1338	<b>498</b>
1.123	1.173	1.135	<b>1.14</b>	0.03	2%	343	<b>128</b>
1.173	1.741	1.772	<b>1.56</b>	0.34	22%	1875	<b>698</b>
1.224	1.198	1.211	<b>1.21</b>	0.01	1%	363	<b>135</b>
1.437	1.236	1.062	<b>1.25</b>	0.19	15%	1494	<b>556</b>

Se utilizó una matriz de Excel la cual contiene las formulas correspondientes para calcular los límites de linealidad, con lo cual se determinó el Límite de detección (LOD) el cual se muestra en la tabla 26.

Tabla 26. Determinación del límite de detección (LOD).

<b>Estimación de LOD</b>			
1.267 nM	En el pocillo de la placa	----->	3.39 µg/kg en el pocillo de la placa
			20.34 µg/kg en el tubo de dilución
			203.40 µg/kg en el extracto

La concentración se reporta no solo en el pocillo, sino también en el extracto de ostra desconocida del cual fue tomada la muestra. Para el caso el LOD en el extracto es de 203.4 µg/kg lo que nos indica la menor concentración de toxina que se puede determinar por este método muy por debajo del límite regulatorio que es 800 µg de STX/Kg. [63]

### 6.3.2 Curva de calibración de STX utilizando extracto sináptico de cerdo preparado localmente como receptor y análisis de muestras desconocidas.

Se realizó la curva de calibración estándar de STX no marcada, se partió de una concentración inicial de STX stock de  $2.688 \times 10^{-4} \text{M}$  y se realizaron una serie de diluciones utilizando como diluyente HCl 0.003 M, como se muestra en la tabla 27.

Tabla 27. Curva de calibración STX no marcada.

Tubo de dilución	Volumen de diluyente (mL)	Volumen de toxina ( $\mu\text{L}$ )	Concentración (M)	Concentración en el ensayo (M)
A	4.38	100 de estándar	$6 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
B	4.5	500 de A	$6 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7}$
C	3.5	1500 de B	$1.8 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-8}$
D	4.5	500 de B	$6 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$
E	4.5	500 de C	$1.8 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-9}$
F	4.5	500 de D	$6 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$
G	4.5	500 de F	$6 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-10}$
H	5	0	0	0

Al igual que la curva de calibración; el patrón de comparación entre ensayos o verificador del control de calidad QC (por sus siglas en inglés Quality Control) que contiene STX al  $1.8 \times 10^{-8} \text{M}$ , se preparó a partir de STX estándar diluyendo con HCl 0.03M.

Se tomó una placa de 96 pocillos y se adicionó 35  $\mu\text{L}$  de disolución amortiguadora a cada pocillo para humedecer el filtro, posteriormente 35  $\mu\text{L}$  de las diluciones de la curva estándar, QC y muestras; cada una por triplicado.

Se muestra en la tabla 28 la distribución de la placa en la cual la curva estándar comprende los pocillos de las columnas 1, 2 y 3; de las filas A-H en un orden descendente en concentración.

El control de calidad QC en las columnas 4, 5 y 6 de la fila A. Se trabajó con dos muestras de extracto sináptico, codificadas como M1D1 y M1D2 las cuales se colocaron de manera que obtuvimos 21 lecturas de cada una.

Tabla 28. Configuración de la placa de 96 pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	QC	QC	QC	M1D2	M1D2	M1D2			
B	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1			
C	$3 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2			
D	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1			
E	$3 \times 10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2			
F	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1	M1D1			
G	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2	M1D2			
H	0	0	0	M1D1	M1D1	M1D1						

Se agregaron 35  $\mu\text{L}$  de STX marcada con tritio y por último se agregaron 105  $\mu\text{L}$  de extracto sináptico preparado localmente.

Se incubó por 60 min, para que se llevase a cabo la reacción de competencia por los sitios activos del receptor, entre la STX estándar y la STX marcada con tritio.

Se filtró al vacío para eliminar las toxinas marcadas y no marcadas que no se enlazaron con el receptor; se agregó 50  $\mu\text{L}$  de optiface como líquido centellante, y se cuantificaron en el contador de centelleo líquido Microbeta Trilux. Ver tabla 29.

Tabla 29. Resultados obtenidos de las cuentas por minuto (en rojo la curva de calibración; en verde el QC; en negro las muestras problema).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10	8	11	81	85	82	167	187	165			
B	14	18	18	95	86	94	159	169	160			
C	30	34	34	78	91	85	119	103	110			
D	56	50	60	79	95	107	125	113	131			
E	86	89	81	79	95	107	125	113	131			
F	119	113	116	117	117	112	192	163	160			
G	136	134	127	160	158	154	219	233	216			
H	140	157	166	131	115	117						

A partir de estos valores de cuentas por minuto (CPM), utilizando una plantilla de Excel se realizó el respectivo tratamiento estadístico, se obtuvo el promedio de las tres replicas, la desviación estándar (DS) y el porcentaje de coeficiente de variación (%CV) como se muestra en las tablas 30 a y b.

Tabla 30a. Determinación de la desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación para los valores de CPM curva de calibración.

Concentración de estándar (nM)	log de concentración (M)	CPM				S	%CV
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio		
1000	-6	10	8	11	9.67	2	16%
100	-7	14	18	18	16.7	2	14%
30	-7.5229	30	34	34	32.7	2	7%
10	-8	56	50	60	55.3	5	9%
3	-8.5229	86	89	81	85.3	4	5%
1	-9	119	113	116	116	3	3%
0.1	-10	136	134	127	132	5	4%
0.000001	-15	140	157	166	154	13	9%

Tabla 30b. Determinación de la desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación para los valores de CPM muestra desconocida.

Diluciones	Código	CPM				S	%C V
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio		
1	QC (3 nM)	81	85	82	82.7	2	3%
50	M1D1	95	86	94	91.7	5	5%
200	M1D2	78	91	85	84.7	7	8%
50	M1D1	79	95	107	93.7	14	15%
200	M1D2	79	95	107	93.7	14	15%
50	M1D1	117	117	112	115	3	3%
200	M1D2	160	158	154	157	3	2%
50	M1D1	131	115	117	121	9	7%
200	M1D2	167	187	165	173	12	7%
50	M1D1	159	169	160	163	6	3%
200	M1D2	119	103	110	111	8	7%
50	M1D1	125	113	131	123	9	7%
200	M1D2	125	113	131	123	9	7%
50	M1D1	192	163	160	172	18	10%
200	M1D2	219	233	216	223	9	4%

Al momento de graficar fue necesario transformar las concentraciones de la curva de nM a logaritmos de la concentración, y utilizando el programa GraphPad Prism 6.

La figura 7 muestra el gráfico obtenido a partir del log de la concentración vs las CPM obtenidas, se observa que la curva presenta la forma sigmoidea característica donde la parte superior representa las uniones de STX Marcada en ausencia de STX estándar y en la parte inferior se presentan los enlaces no específicos con alta saturación de STX no marcada, el programa determina el EC<sub>50</sub> que representa el punto medio entre la concentración de STX radio marcada y la STX no marcada por el sitio activo del receptor; a partir de esto se determinó el intervalo de linealidad comprendido entre los puntos EC<sub>20</sub> a EC<sub>80</sub>.

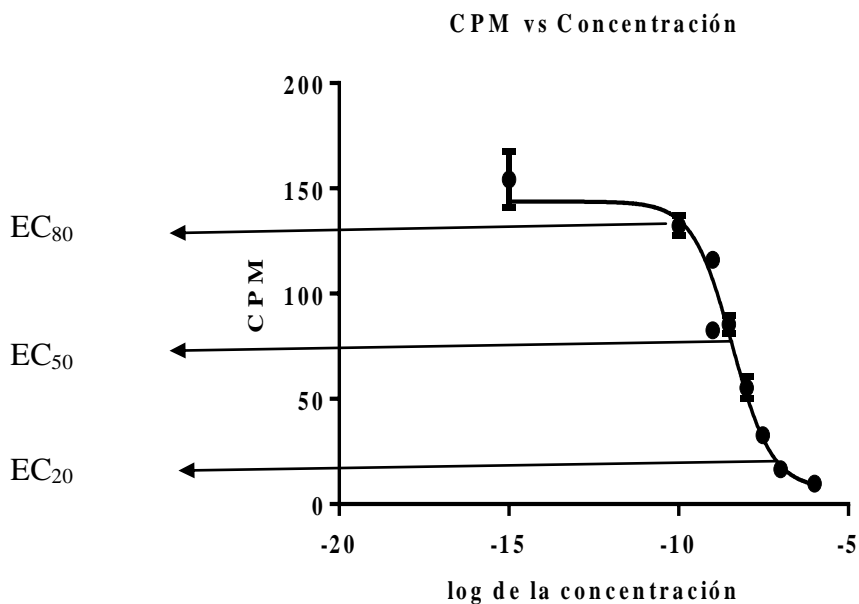


Figura 7. Curva de calibración utilizando como receptor extracto sináptico de cerebro de cerdo preparado localmente.

A partir de la gráfica se determinó la ecuación correspondiente y se estableció el máximo y el mínimo de la curva, además se obtuvo la concentración de STX en los puntos de importancia estadística estos datos se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Parámetros estadísticos determinados a partir de la curva de calibración.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
<b>Mínimo</b>	7.256	EC <sub>20</sub>	2.46x10 <sup>-08</sup> M    24.61 nM
<b>Máximo</b>	143.7	EC <sub>50</sub>	3.79x10 <sup>-09</sup> M    3.794 nM
<b>LogEC<sub>50</sub></b>	-8.42	EC <sub>70</sub>	1.21x10 <sup>-09</sup> M    1.21 nM
<b>Pendiente</b>	-0.74	EC <sub>80</sub>	5.85x10 <sup>-10</sup> M    0.585 nM

En la tabla 32 se presenta los datos de log de concentraciones de las muestras desconocidas, determinadas a partir de la ecuación obtenida de la gráfica, (figura 6) además, se calculó la

relación entre el máximo y el mínimo de la curva (B/Bmax) que establece si la concentración se encuentra en parte lineal de la curva, de esta manera se puede concluir si la muestra está muy diluida en el caso que B/Bmax sea mayor a 0.7 y muy concentrada en el caso que sea menor a 0.2.

Tabla 32. Determinación de la concentración de las muestras desconocidas, determinados por extrapolación de la curva estándar.

Logaritmo de concentración (M)			Código de la muestra	Dilución	B/Bmax				B/Bmax rango 0.2 a 0.7
Replica 1	Replica 2	Replica 3			Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio (M)	
-8.515	-8.585	-8.533	QC (3 nM)	1	0.540	0.570	0.550	0.55	ok
-8.765	-8.603	-8.747	M1D1	50	0.643	0.577	0.640	0.62	ok
-8.464	-8.692	-8.585	M1D2	200	0.518	0.614	0.570	0.57	ok
-8.481	-8.765	-9.006	M1D1	50	0.526	0.643	0.730	0.63	ok
-8.481	-8.765	-9.006	M1D2	200	0.526	0.643	0.730	0.63	ok
-9.247	-9.247	-9.120	M1D1	50	0.804	0.804	0.770	0.79	diluido
--	--	--	M1D2	200	1.119	1.105	1.080	1.10	diluido
-9.752	-9.195	-9.248	M1D1	50	0.907	0.790	0.800	0.83	diluido
			M1D2	200	1.171	1.317	1.160	1.22	diluido
--	--	--	M1D1	50	1.112	1.185	1.120	1.14	diluido
-9.303	-8.921	-9.073	M1D2	200	0.819	0.702	0.750	0.76	diluido
-9.497	-9.144	-9.752	M1D1	50	0.863	0.775	0.910	0.85	diluido
-9.497	-9.144	-9.752	M1D2	200	0.863	0.775	0.910	0.85	diluido
--	--	--	M1D1	50	1.354	1.141	1.120	1.21	diluido
--	--	--	M1D2	200	1.552	1.654	1.530	1.58	diluido

Se hizo la conversión de unidades, a partir del log de concentración a ng/mL, que es la forma de presentar los resultados según la norma internacional, se calcularon el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación; tanto del QC como de las muestras problemas como se aprecia en la tabla 33.



Tabla 33. Valores finales de coeficiente de variación y concentración de STX en las muestras problema.

Concentración de STX en el ensayo (nM)				S	%CV	STX en el extracto (nM)	STX en el extracto (ng/mL)
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio				
<b>3.052</b>	2.600	2.933	<b>2.86</b>	0.23	8%	17	<b>6</b>
<b>1.717</b>	2.497	1.793	<b>2.00</b>	0.43	21%	601	<b>224</b>
<b>3.437</b>	2.034	2.600	<b>2.69</b>	0.71	26%	3229	<b>1202</b>
<b>3.304</b>	1.717	0.987	<b>2.00</b>	1.18	59%	601	<b>224</b>
<b>3.304</b>	1.717	0.987	<b>2.00</b>	1.18	59%	2403	<b>895</b>
<b>0.565</b>	0.565	0.759	<b>0.63</b>	0.11	18%	189	<b>70</b>
<b>0.000</b>	0.000	0.000	<b>0</b>	0.00	0	0	<b>0</b>
<b>0.177</b>	0.639	0.565	<b>0.46</b>	0.25	54%	138	<b>51</b>
<b>0.000</b>	0.000	0.000	<b>0</b>	0.00	0	0	<b>0</b>
<b>0.000</b>	0.000	0.000	<b>0</b>	0.00	0	0	<b>0</b>
<b>0.497</b>	1.199	0.845	<b>0.85</b>	0.35	41%	1016	<b>378</b>
<b>0.318</b>	0.717	0.177	<b>0.40</b>	0.28	69%	121	<b>45</b>
<b>0.318</b>	0.717	0.177	<b>0.40</b>	0.28	69%	485	<b>181</b>

Se utilizó una matriz de Excel la cual contiene las formulas correspondientes para calcular los límites de linealidad, con lo cual se determinó el Límite de detección (LOD) el cual se muestra en la tabla 34.

Tabla 34. Determinación del límite de detección (LOD).

Estimación del LOD	
0.585 nM	En el pocillo de la placa ----> 1.57 µg/kg en el pocillo
	9.40 µg/kg en el tubo de dilución
	94.01 µg/kg en el extracto

La concentración se reporta no solo en el pocillo, sino también en el extracto de ostra desconocida del cual fue tomada la muestra. Para el caso el LOD en el extracto es de 94.01 µg/kg lo que nos indica la menor concentración de toxina que se puede determinar por este método muy por debajo del límite regulatorio que es 800 µg de STX/Kg. [63]

## 6.4 Validación del ensayo receptor ligando para moluscos bivalvos.

### 6.4.1 Linealidad

La norma ISO/IEC 17025 establece la linealidad como un parámetro de validación; para el ensayo del ácido bicinconínico se obtuvo una ecuación de linealidad  $y = 0.001x + 0.1447$  y un coeficiente de correlación lineal de 0.999 dicho resultado refleja una linealidad aceptable ya que para dicho coeficiente su valor máximo es la unidad, por tanto da paso a la validación

### 6.4.2 Precisión

Se obtuvieron valores de %CV inferiores a 5% parámetros que reflejan una aceptable reproducibilidad en los resultados, estos datos se resumen en la tabla 35.

Tabla 35. Comparación de parámetros estadísticos para la determinación de contenido proteico.

Contenido de proteína de cerebro local		Contenido de proteína de cerebro estándar	
Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
10.99	0.55	10.99	0.4
CV	0.05	CV	0.036
<b>%CV</b>	<b>5.04</b>	<b>%CV</b>	<b>3.66</b>

### 6.4.3 LOD

.Haciendo una comparación entre las curvas de calibración del cerebro de cerdo estándar y el cerebro de cerdo preparado localmente se puede denotar que dichas curvas presentan la misma tendencia sigmoidea, con la diferencia que la curva obtenida utilizando cerebro preparado localmente tiene un rango menor como se observa en la figura 8; por lo cual las concentraciones de STX que pueden determinarse con la cura de cerebro local son mucho menores.

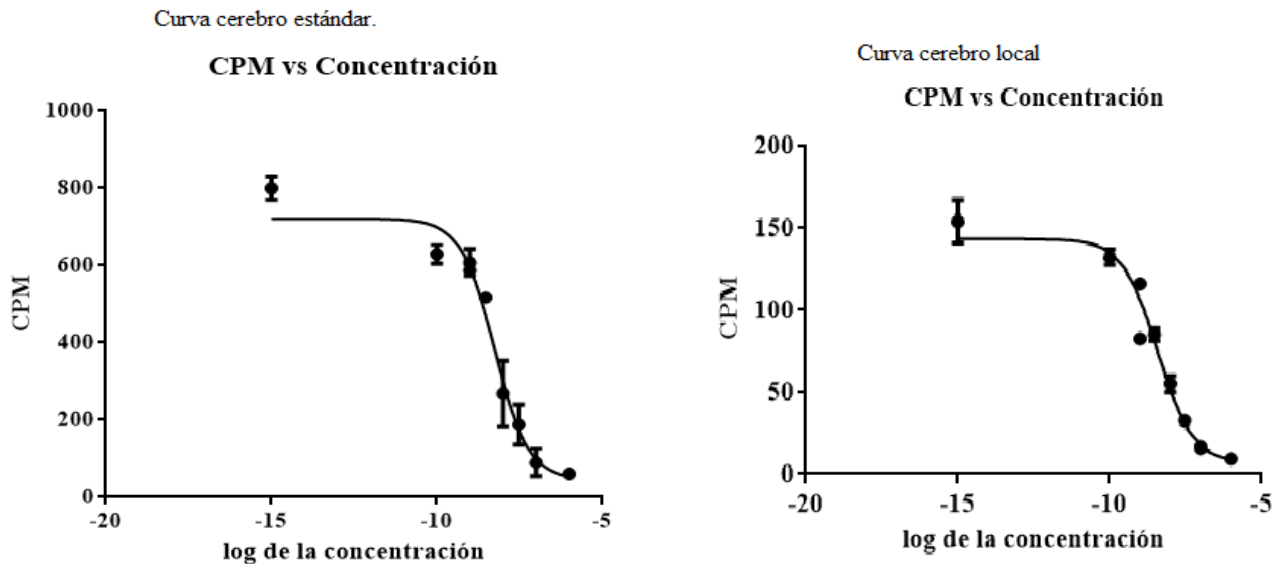


Figura 8. Comparación entre curvas de calibración.

Para la validación no se pudo realizar la intercomparación de las curvas debido a la diferencia en cuanto a rango; pero los valores obtenidos para los parámetros estadísticos permiten validar cada ensayo por separado en el rango que delimita la respectiva curva.

Tabla 36. Comparación de parámetros estadísticos para el RBA.

Concentración de STX estándar (nM)	Curva de calibración cerebro estándar			Curva de calibración cerebro local		
	Promedio CPM	S	%CV	Promedio CPM	S	%CV
<b>1000</b>	59.7	3	5%	9.67	2	16%
<b>100</b>	89.3	35	40%	16.7	2	14%
<b>30</b>	188	51	27%	32.7	2	7%
<b>10</b>	268	86	32%	55.3	5	9%
<b>3</b>	484	57	12%	85.3	4	5%
<b>1</b>	607	35	6%	116	3	3%
<b>0.1</b>	629	24	4%	132	5	4%
<b>0.000001</b>	719	142	20%	154	13	9%
	LOD = <b>203.4 µg/kg</b>			LOD = <b>94.01 µg/kg</b>		

Se determino el límite de detección en las condiciones de trabajo del método para ambos cerebros cuyos valores están por debajo del valor regulatorio el cual es de 800 µg/kg.

## VII. CONCLUSIONES.

- A partir del rango delimitado por la curva de calibración se estableció que la dilución óptima para el ensayo del BCA es de 100  $\mu$  de extracto para 1000  $\mu$ L de disolución amortiguadora, ya que los valores de absorbancia para las muestras se ajustan mejor a dicho rango.
- El valor de concentración para el extracto sináptico local es de 10.99 mg/mL, el cual se obtuvo a partir de la ecuación lineal de un total de 50 muestras, para las cuales se obtuvo un porcentaje de coeficiente de variación de 5.048% lo cual nos demuestra que son homogéneas entre sí. Ya que el porcentaje de coeficiente de variación máximo para este tipo de análisis es de 7.3%.
- Al igual se realizó la determinación con extracto de proteína estándar obteniendo una concentración de 10.99 mg/mL y un %CV de 3.656. Se demostró que existe una relación entre las concentraciones de extracto preparado localmente y extracto estándar, por lo tanto dicho extracto local puede ser utilizado para la determinación de STX por medio de RBA.
- Las curvas de calibración de STX presentan la misma forma sigmoidea, el extracto local si presenta resultado positivos al ensayo, solo que en un rango lineal menor, en comparación con la curva sigmoidea presentada por el extracto estándar, esto podría deberse a una previa desnaturalización de la proteína (perdida de la efectividad), incluso antes de colectarla en la granja La Bodeguita del Cerdo, ya que no nos proporcionaron información de cuánto tiempo tenían de muertos los cerdos al momento de colectar los cerebros de los mismos.
- El ensayo receptor ligando funciona en el rango de concentración delimitado por la curva de calibración, tomando como referencia los resultados obtenidos para los parámetros de validación, podemos determinar que todos se encuentran bajo los valores establecidos como máximos; por tanto se establece la validación de la técnica en dicho rango. abriendo la posibilidad de producir los extractos sinápticos de manera local.

## VIII. RECOMENDACIONES.

- Tener en cuenta los criterios regulatorios de la toma, manejo y transporte de muestras para poder asegurar la integridad de las mismas, ya que hay compuestos químicos que pueden sufrir desnaturalización por cambios bruscos de temperatura, foto degradación.
- Para desarrollar el método de manera óptima es necesario tener todo correctamente adaptado, en un espacio físico adecuado por lo cual se le hace el llamado a las autoridades a evaluar las condiciones físicas tanto de la escuela de química como de LABTOX-UES.
- Ser más exigentes a la hora de recolectar la materia prima (cerebros) para los extractos sinápticos, tomando en cuenta el tiempo de muerte del animal, su peso, edad, raza y realizar un control de temperatura más minucioso, todo esto podría asegurar una mejor integridad de la muestra y por lo tanto obtener un resultado para un rango mucho mayor.
- Realizar los ensayos necesarios tanto en la cuantificación de la proteína, como en el ensayo receptor ligando con un mejor control de los factores que podrían propiciar errores (Analistas, Equipos, Reactivos, pH, temperatura, Tiempo de reacción, Estabilidad de la muestra, Otros), para poder así establecer la validación del ensayo en un rango de concentración mayor.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

[1] GUIRES USUP\*, CHUI-PIN LEAW, MEI-YEE CHEAH, ASMAT AHMAD, BOON-KOON NG, Analysis of paralytic shellfish poisoning toxin congeners by a sodium channel receptor binding assay, Marine Science Programme, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia, *Toxicon* 44 (2004) 37-43.

[2] LYNDON E. LLEWELLYN, The Behavior of Mixtures of Paralytic Shellfish Toxin in Competitive Binding Assays, Australian Institute of Marine Science, PMB 3, Townsville MC, Queensland, 4810, Australia, *Chem. Res. Toxicol.* 2006, 19, 661-667.

[3] CHISTINE L. POWELL, GREGORY J. DOUCETTE, A receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins: recent advances and applications, Marine biotoxins program, National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)/ National Ocean Service, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, 219 Fort Johnson Road, Charleston, SC, USA 29412. *Nat. Toxins* 7: 393-400.

[4] FAN ZHANG, XUNXUN XU, TINGTING LI AND ZHONGHUA LIU. Shellfish Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels, Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China; *Mar. Drugs* 2013, 11, 4698-4723; doi:10.3390/md11124698.

[5] HELENA DENAC, MEIKE MEVISSSEN, GÜNTER SCHOLTYSIK. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2000) 362: 453–479 DOI 10.1007/s002100000319.

[6] JOSÉ I. CARRETO, NORA G. MONTOYA Y MARIO O. CARIGNAN. Florecimientos de algas nocivas, Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino.

[7] FAO. 2005. Biotoxinas marinas, alimentación y nutrición (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5486s/y5486s00.pdf>)

- [8] SIUYAMALI.E R. RUBERU, YUN-GAN LIU, CAROLYN T. WONG', and S. KUSM PERERA, GREGG W. LANGLOIS, GREGORY J. DOUCETTE and CHRISTINE L. P OWELL; Receptor Binding Assay for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: Optimization and Interlaboratory Comparison. California Department of Health Services,, Sanitation and Radiation Laboratories Branch, 215 1 Berkeley Way, Berkeley, CA 94704. California Department of Health Services, Environmental Management Branch, 2151 Berkeley Way, Berkeley, CA 94704. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)INational Ocean Service, Marine Biotoxins Program, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, 21 9 Fort Johnson Rd, Charleston, SC 294 12. RUBERUE TAL.: JOURNALOAF OAC INTERNATIONALAVLO L. 86, No. 4,2003.
- [9] GLIBERT PM, ANDERSON DM, GENTIEN P, GRANÉLI E, The global, complex phenomena of harmful algal blooms, *Oceanography* 15 (2005) 136-47.
- [10] ANDERSON DM, REGUERA B, PITCHER GC, ENEVOLDSEN HO, The IOC International Harmful Algal Bloom Program: History and Science Impacts, *Oceanography* 23 (2010) 72-85.
- [11] SMAYDA TJ, Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea, *Limnology and Oceanography* 42 (1997) 1137-53.
- [12] TILLMANN U, ELBRACHTER M, KROCK B, JOHN U, CEMBELLA A, *Azadinium spinosum* gen. et sp nov (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins, *Eur J Phycol* 44 (2009) 63-79.
- [13] ALIGIZAKI K, NIKOLAIDIS G, The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean sea, Greece, *Harmful Algae* 5 (2006) 717-30.
- [14] ALIGIZAKI K, NIKOLAIDIS G, Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysia* in the Mediterranean Sea, *J Biol Res-Thessalon* 9 (2008) 75-82.



- [15] ALIGIZAKI K, NIKOLAIDIS G, KATIKOU P, BAXEVANIS AD, ABATZOPOULOS TJ, Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters, *Harmful Algae* 8 (2009) 299-311.
- [16] VERITY PG, Expansion of potentially harmful algal taxa in a Georgia Estuary (USA), *Harmful Algae* 9 (2010) 144-52.
- [17] ANDERSON DM. *The Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: Multidisciplinary Approaches to Research and Management*. Paris: UNESCO, 2007.
- [18] ANDERSON DM, Approaches to monitoring, control and management of harmful algalblooms (HABs), *Ocean & Coastal Management* 52 (2009) 342-47.
- [19] HALL S, STRICHARTZ G, MOCZYDLOWSKI E, RAVINDRAN A, REICHARDT PB, *The Saxitoxins - Sources, Chemistry, and Pharmacology*, ACS Symp Ser 418 (1990) 29-65.
- [20] VAN DOLAH F, "Diversity of marine and freshwater algal toxins", *Seafood and freshwater toxins Pharmacology, physiology, and detection* (BOTANA LM, ed.), Marcel Dekker, Inc New York Basel, University of Snatiago de Compostela, Lugo, Spain (2000) 19-43.
- [21] VAN DOLAH FM, Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence, *Environ Health Perspect* 108 (2000) 133-41.
- [22] LANDSBERG JH, The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms., *Reviews in Fisheries Science* 10 (2002) 113-390.
- [23] LLEWELLYN LE, Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors, *Nat Prod Rep* 23 (2006) 200-22.
- [24] WIESE M, D'AGOSTINO PM, MIHALI TK, MOFFITT MC, NEILAN BA, Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs, *Marine Drugs* 8 (2010) 2185-211.

- [25] LUCKAS B, HUMMERT C, OSHIMA Y, "Analytical methods for paralytic shellfish poisons", Manual on Harmful Marine Microalgae (HALLEGRAEFF GM, ANDERSON DM, CEMBELLA AD, eds). IOC of UNESCO, Paris (2003) 191-209.
- [26] CEMBELLA AD, DOUCETTE GJ, GARTHWAITE I, "In vitro assays for phycotoxins", Manual on Harmful Marine Microalgae (HALLEGRAEFF GM, ANDERSON DM, CEMBELLA AD, eds). IOC of UNESCO, Paris (2003) 297-345.
- [27] LANDSBERG J, VAN DOLAH FM, DOUCETTE GJ, "Marine and estuarine harmful algal blooms: impacts on human and animal health", Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment (BELKIN S, COLWELL RR, eds). Springer, NY (2005) 165-215.
- [28] SUÁREZ-ISLA BA, "Paralytic shellfish toxins – pharmacology, and toxicology biological detection methods", Seafood and Freshwater Toxins Pharmacology, Physiology, and Detection (BOTANA LM, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2008) 197-205.
- [29] TAYLOR FJR, FUKYUO Y, LARSEN J, HALLEGRAEFF GM, "Taxonomy of harmful dinoflagellates", Manual on Harmful Marine Microalgae (HALLEGRAEFF GM, ANDERSON DM, CEMBELLA AD, eds). IOC of UNESCO, Paris (2003) 389-432.
- [30] CEMBELLA AD, QUILLIAM MA, LEWIS NI, et al., The toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the probable cause of mortality of caged salmon in Nova Scotia, Harmful Algae 1 (2002) 313-25.
- [31] DOUCETTE GJ, TURNER JT, POWELL CL, KEAFER BA, ANDERSON DM, Trophic accumulation of PSP toxins in zooplankton during *Alexandrium fundyense* blooms in Casco Bay, Gulf of Maine, April-June 1998. I. Toxin levels in A-fundyense and zooplankton size fractions, Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography 52 (2005) 2764-83.
- [32] POULTON NJ, KEAFER BA, ANDERSON DM, Toxin variability in natural populations of *Alexandrium fundyense* in Casco Bay, Maine - evidence of nitrogen limitation, Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography 52 (2005)2501-21.

- [33] CAMPBELL K, STEWART LD, DOUCETTE GJ, et al., Assessment of specific binding proteins suitable for the detection of paralytic shellfish poisons using optical biosensor technology, *Anal Chem* 79 (2007) 5906-14.
- [34] CATTERALL WA, From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels, *Neuron* 26 (2000) 13-25.
- [35] LEVIN RE, Development of a Tropical Fish Assay for Saxitoxin, *Journal of Food Safety* 13 (1992) 1-5.
- [36] GESSNER BD, BELL P, DOUCETTE GJ, et al., Hypertension and identification of saxitoxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks, *Toxicol* 35 (1997) 711-22.
- [37] LANDSBERG JH, HALL S, JOHANNESSEN JN, et al., Saxitoxin puffer fish poisoning in the United States, with the first report of *Pyrodinium bahamense* as the putative toxin source, *Environ Health Perspect* 114 (2006) 1502-07.
- [38] HALLEGRAEFF GM, A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase, *Phycologia* 32 (1993) 79-99.
- [39] ANDERSON DM, Red Tides, *Sci Am* 271 (1994) 62-68.
- [40] BRICELJ VM, SHUMWAY SE, Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation, *Rev Fish Sci* 6 (1998) 315-83.
- [41] DEEDS JR, LANDSBERG JH, ETHERIDGE SM, PITCHER GC, LONGAN SW, Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning, *Marine Drugs* 6 (2008) 308-48.
- [42] GESSNER BD, MCLAUGHLIN JB, "Epidemiologic impact of toxic episodes: neurotoxic toxins", *Seafood and Freshwater Toxins Pharmacology, Physiology, and Detection* (BOTANA LM, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2008) 197-205.
- [43] SHUMWAY SE, ALLEN SM, BOERSMA PD, Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events?, *Harmful Algae* 2 (2003) 1-17.

- [44] VAN DOLAH FM, DOUCETTE GJ, GULLAND F, BOSSART GD, ROWLES T, "Impacts of algal toxins on marine mammals", *Toxicology of Marine Mammals* (VOS J, BOSSART GD, FOURNIER M, O'SHEA T, eds). Taylor and Francis, NY (2003) 247-69.
- [45] DOUCETTE GJ, CEMBELLA AD, MARTIN JL, MICHAUD J, COLE TVN, ROLLAND RM, Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in North Atlantic right whales *Eubalaena glacialis* and their zooplankton prey in the Bay of Fundy, Canada, *Mar Ecol-Prog Ser* 306 (2006) 303-13.
- [46] KVITEK RG, DEGANGE AR, BEITLER MK, Paralytic Shellfish Poisoning Toxins Mediate Feeding-Behavior of Sea Otters, *Limnology and Oceanography* 36 (1991) 393- 404.
- [47] VAN DOLAH FM, RAMSDELL JS, Review and assessment of in vitro detection methods for algal toxins, *J AOAC Int* 84 (2001) 1617-25.
- [48] FERNÁNDEZ ML, RICHARD DJA, CEMBELLA AD, "In vitro assays for phycotoxins", *Manual on Harmful Marine Microalgae* (HALLEGRAEFF GM, ANDERSON DM, CEMBELLA AD, eds). IOC of UNESCO, Paris (2003) 347-80.
- [49] CHRISTIAN B, LUCKAS B, Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods, *Anal Bioanal Chem* 391 (2008) 117-34.
- [50] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group. Adopted on 25 March 2009, *EFSA Journal* 1019 (2009) 1-76.
- [51] CAMPBELL K, STEWART LD, DOUCETTE GJ, et al., Assessment of specific binding proteins suitable for the detection of paralytic shellfish poisons using optical biosensor technology, *Anal Chem* 79 (2007) 5906-14.
- [52] BOTANA LM, VILARINO N, ALFONSO A, et al., The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection, *Trac-Trend Anal Chem* 29 (2010) 1316-25.

- [53] LAWRENCE JF, NIEDZWIADK B, MENARD C, Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study, *J AOAC Int* 88 (2005) 1714-32.
- [54] OSHIMA Y, Postcolumn Derivatization Liquid-Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins, *J AOAC Int* 78 (1995) 528-32.
- [55] SAYFRITZ SJ, AASEN JA, AUNE T, Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection, *Toxicon* 52 (2008) 330-40.
- [56] OFFICIAL METHOD OF ANALYSIS, "Method 959.08", AOAC International (17TH, ed.), Gaithersburg, MD (1999).
- [57] JELLETT JF, ROBERTS RL, LAYCOCK MV, QUILLIAM MA, BARRETT RE, Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC mouse bioassay, *Toxicon* 40 (2002) 1407-25.
- [58] USLEBER E, DIETRICH R, BURK C, SCHNEIDER E, MARTLBAUER E, Immunoassay methods for paralytic shellfish poisoning toxins, *J AOAC Int* 84 (2001) 1649-56.
- [59] FONFRIA ES, VILARINO N, CAMPBELL K, et al., Paralytic shellfish poisoning detection by surface plasmon resonance-based biosensors in shellfish matrixes, *Anal Chem* 79 (2007) 6303-11.
- [60] MANGER RL, LEJA LS, LEE SY, HUNGERFORD JM, WEKELL MM, Tetrazoliumbased cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins, *Anal Biochem* 214 (1993) 190-94.

- [61] DOUCETTE GJ, LOGAN MM, RAMSDELL JS, VANDOLAH FM, Development and preliminary validation of a microtiter plate-based receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins, *Toxicon* 35 (1997) 625-36.
- [62] VAN DOLAH FM, LEIGHFIELD TA, DOUCETTE GJ, BEAN L, NIEDZWIADK B, RAWN DF, Single-laboratory validation of the microplate receptor binding assay for paralytic shellfish toxins in shellfish, *J AOAC Int* 92 (2009) 1705-13.
- [63] VAN DOLAH FM, FIRE SE, LEIGHFIELD TA, MIKULSKI CM, DOUCETTE GJ, Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish by Receptor Binding Assay: Collaborative Study, *J AOAC Int* 95 (2012) 795-812.
- [64] CHINAIN M, DARIUS HT, UNG A, et al., Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture, *Toxicon* 56 (2010) 739-50.
- [65] DARIUS HT, PONTON D, REVEL T, et al., Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay, *Toxicon* 50 (2007) 612-26.
- [66] BOTTEIN DECHRAOUI MY, TIEDEKEN J, PERSAD R, et al., Use of two detection methods for discriminating ciguatoxins from brevetoxins: application to Great Barracuda from Florida, *Toxicon* 46 (2005) 261-70.
- [67] HAMILTON B, WHITTLE N, SHAW G, EAGLESHAM G, MOORE MR, LEWIS RJ, Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish, *Toxicon* 56 (2010) 668-73.
- [68] MILLER, JAMES. Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica. Pearson Educación S.A. Madrid. 2002.
- [69] CASTRO CELS, MARTA, Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria. Validación De Métodos Analíticos.
- [70] MONTGOMERY, DOUGLAS. Diseños y Análisis de Experimentos. Limusa-Wiley, México. 2005

[71] FAN ZHANG, XUNXUN XU, TINGTING LI AND ZHONGHUA LIU. **Shellfish Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels.** *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4698-4723; doi:10.3390/md11124698.

[72] Atlas de Fitoplacton Marino/Jaime Javier Espinosa Navarrete, Oscar Armando Amaya Monterros, Cesiah Rebeca Quintanilla Quintanilla. 1° ed. Ciudad Universitaria, San Salvador, LABTOX-UES; Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, 2013.

[73] ISO/IEC 17025:2005, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

## **X. ANEXOS**

### **9.1 Anexo 1 “Preparación de membrana de cerebro de rata”**

#### **3. MEMBRANE PREPARATION**

##### **3.1. RAT BRAIN MEMBRANE PREPARATION FOR CTX AND STX RBA**

###### **Apparatus**

- Teflon/glass homogenizer (i.e., motorized Teflon pestle and glass tube);
- Motorized tissue homogenizer (Polytron or small handheld blender);
- High speed centrifuge and fixed angle rotor capable of 20,000 x g (rcf);
- Centrifuge tubes (12–15 mL) rated for > 20,000 x g (rcf);
- 2 mL plastic cryovials;
- 300 or 500 mL graduated beaker;
- Disposable 5 and 10 mL pipettes;
- Forceps for handling rat brains.

###### **Reagents**

- 20 rat brains, male Sprague-Dawley, six wk old (Hilltop Lab Animals);
- 1L buffer pH 7.4: 100 mM MOPS, pH 7.4 (Sigma, St. Louis) containing 100 mM choline chloride (Sigma), 0.1 mM PMSF\* \*PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride, Sigma) stock preparation (0.1 M): dissolve 0.0174 g PMSF in 1 mL isopropanol; a larger volume may be prepared and stored in 1 mL aliquots at -20o C (e.g. 0.174 g in 10 mL isopropanol). Prior to



use thaw PMSF and thoroughly mix to redissolve completely; then add to 1L buffer fresh daily at each use. Do not refreeze aliquots.

### **Procedure**

1. Remove medulla from each brain using 'pointed' forceps and discard.
2. Place cerebral cortices in ice-cold buffer pH 7.4 and place container on ice. Homogenize two brains in 25 mL buffer pH 7.4 (12.5 mL per brain) in a glass homogenizer tube with a Teflon probe. Homogenize with 10 up and down strokes at 385 rpm on ice slurry. Keep tube in ice at all times. Pour homogenized tissue into 250 mL beaker on ice and repeat procedure with remaining cortices
3. Pool homogenized tissue and transfer to high speed centrifuge tubes. Centrifuge at 20,000 x g for 15 minutes at 4°C. Quickly aspirate (or pour off) supernatant and resuspend pellets in 10 mL buffer pH 7.4 per brain (200 mL for 20 brains).
4. Pool resuspended membrane preparation in a 500 mL beaker and keep on ice. Polytron at 70% full speed for 20 seconds.
5. Aliquot 2 mL/tube in cryogenic vials: cryotube must be kept on ice and mixed prior each aliquot. Freeze and store at -80°C. This preparation is stable for at least 6months.
6. Determine protein concentration of the membrane preparation and hence the dilution needed for a final 1mg/mL protein concentration in the assay

## 9.2 Anexo 2 “Ensayo BCA”

### Protein Assay BCA

Protein Assay Reagent Kit: the protein concentration of the membrane preparation is determined using the Micro BCA (Pierce Micro BCA Protein Assay Reagent Kit #23235, microplate method) or #23225 (tube method) protein assay kit or equivalent protein assay.

Kit Contents:

-BCA Reagent A, 1000mL (in Product No. 23225) or 500mL (in Product No. 23227), containing sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1M sodium hydroxide

-BCA Reagent B, 25mL, containing 4% cupric sulfate

Albumin Standard Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA) at 2mg/mL in 0.9% saline and 0.05% sodium azide

### Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures)

#### A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1mL ampule of 2mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volumen for three replications of each diluted standard.

Table 1. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL)

Vial	Volume of diluent (μL)	Volume and Source of BSA (μL)	Final BSA Concentration (μg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

### B. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

1. Use the following formula to determine the total volume of WR required:

$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$

Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:

$(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2\text{mL}) = 48\text{mL WR required}$

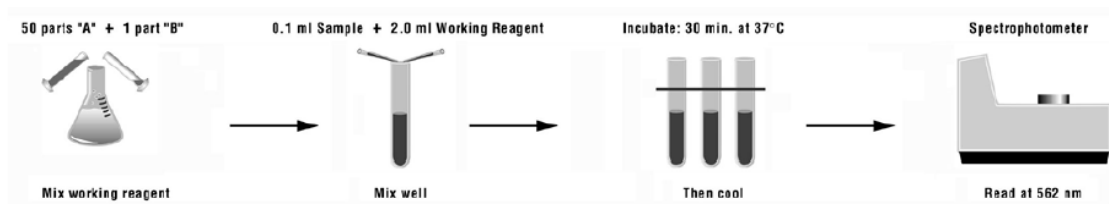
Note: 2.0mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200μL of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.

2. Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50mL of Reagent A with 1mL of Reagent B.

Note: When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based

on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

### Procedure Summary (Test-tube Procedure, Standard Protocol)



### Test-tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)

1. Pipette 0.1mL of each standard and unknown sample replicate into an appropriately labeled test tube.
2. Add 2.0mL of the WR to each tube and mix well.
3. Cover and incubate tubes at selected temperature and time:
  - Standard Protocol: 37°C for 30 minutes (working range = 20-2000µg/mL)
  - RT Protocol: RT for 2 hours (working range = 20-2000µg/mL)
  - Enhanced Protocol: 60°C for 30 minutes (working range = 5-250µg/mL)

#### Notes:

- Increasing the incubation time or temperature increases the net 562nm absorbance for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.
  - Use a water bath to heat tubes for either Standard (37°C incubation) or Enhanced (60°C incubation) Protocol. Using a forced-air incubator can introduce significant error in color development because of uneven heat transfer.
4. Cool all tubes to RT.

5. With the spectrophotometer set to 562nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water. Subsequently, measure the absorbance of all the samples within 10 minutes.

Note: Because the BCA assay does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, no significant error will be introduced if the 562nm absorbance measurements of all tubes are made within 10 minutes of each other.

6. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm absorbance measurement of all other individual standard and unknown sample replicates.

7. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in  $\mu\text{g/mL}$ . Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

### **9.3 Anexo 3 “Extracción de STX”**

#### **4.2.1 STX extraction from shellfish**

##### **Apparatus and Supplies**

- Micropipettors (1–1000  $\mu$ L variable volumes) and disposable tips
- 15 and 50 mL conical plastic centrifuge tubes
- Ice bucket and ice
- Vortex mixer
- 1L volumetric flask
- -80°C freezer
- -20°C freezer
- Refrigerator
- pH meter or pH paper
- Hot plate
- 10 mL graduated cylinder
- Centrifuge for 15 mL tubes

##### **Reagents**

- 0.1 and 1 M hydrochloric acid (HCl)
- 0.1 M NaOH
- Water, deionized ( $dH_2O$ )

1. Shuck shellfish to obtain ~ 100 g of meat. Drain on a sieve and homogenize 3 minute in a blender Homogenate may be stored frozen at -20°C
2. Accurately weigh 100 g tissue homogenate into a tared 500 mL beaker.
3. Add 100 mL of 0.1 N HCl, stir thoroughly and check pH. The pH should be < 4.0, preferably 3.0. If necessary, adjust pH as described below.
4. Heat mixture, boil gently for 5 minutes, and cool to room temperature. Adjust cooled mixture to pH 3.0-4.0 (never > 4.5) as detected by a pH meter or pH paper. To lower pH, add 5 N HCl dropwise with stirring; to raise pH, add 0.1 N NaOH dropwise with mixing to prevent local alkalization and consequent destruction of toxin.
5. Transfer mixture to graduated cylinder and dilute to 200 mL.
6. Return mixture to beaker, stir to homogeneity, and let settle until a portion of the supernatant is translucent.
7. Pour approximately 15 mL of the supernatant into a centrifuge tube. Centrifuge at 3,000 x g or higher for 10 minutes.
8. Filter supernatant through 0.45 µm nylon filter (may need GF/F glass fiber pre-filter).
9. Store extracts at -20°C until tested with receptor binding assay

## **9.4 Anexo 4 “Protocolo Receptor Binding Assay”**

### **4.3. RECEPTOR BINDING ASSAY PROCEDURE**

#### **4.3.1. Preparation of stock solutions and standards for assay**

##### **Assay Buffer MOPS (100nM) choline chloride (100nM), pH 7.4**

- weigh out 20.9 g of MOPS (3-morpholinopropanesulfonic acid) and 13.96 g of choline chloride and add to 900 mL dH<sub>2</sub>O
- adjust pH to 7.4 with NaOH while stirring
- transfer quantitatively to volumetric flask and bring to a final volume of 1 L with dH<sub>2</sub>O
- store at 4°C

##### **Radioligand solution: [3H]STX:**

Stock [3H]STX is provided in 50 µCi ampoules, 24 Ci/mmol, 0.1 mCi/mL (equivalent to 4.17 µM).

- Prepare a 15 nM working solution of [3H]STX for each assay fresh daily: 14 µL of stock [3H] STX + 3.86 mL Assay Buffer (this will provide a 2.5 nM final concentration in microplate wells). Note that the amount of [3H] STX added may vary according to the specific activity of the stock [3H]STX.
- Measure total counts of each working solution prior to running an assay: add 35 µL of the [3H]STX working solution to a liquid scintillation vial with 4 mL scintillant and count using a liquid scintillation counter. A volume of 35 µL of the [3H]STX working solution should contain 27,650 dpm. Depending on the efficiency of the scintillation counter used,



the corresponding CPM will vary, but should be consistent day to day and within 15% of the expected value.

### Unlabelled STX reference standard

STX diHCl reference standard NIST RM 8642 is provided at a concentration of 268.8  $\mu\text{M}$  (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A “bulk” serial dilution for the standard curve is made up in advance and stored at 4°C for up to 1 month. The use of bulk reference dilutions minimizes the pipetting needed for setting up an assay routinely and improves day to day repeatability.

To make up the standard curve perform the following STX diHCl serial dilutions in 0.003 M HCl (from a 3 M stock, 50  $\mu\text{L}$  in 50 mL)

Tube	Stock	In assay*
100 $\mu\text{L}$ 268.8 $\mu\text{M}$ STX + 4.38 mL 0.003 M HCL	$6 \times 10^{-6}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M
500 $\mu\text{L}$ $6 \times 10^{-6}$ M + 405 mL 0.003 M HCL	$6 \times 10^{-7}$ M	$1 \times 10^{-7}$ M
1.5 mL $6 \times 10^{-7}$ M + 3.5 mL 0.003 M HCL	$1.8 \times 10^{-7}$ M	$3 \times 10^{-8}$ M
500 $\mu\text{L}$ $6 \times 10^{-7}$ M + 4.5 mL 0.003 M HCL	$6 \times 10^{-8}$ M	$1 \times 10^{-8}$ M
500 $\mu\text{L}$ $1.8 \times 10^{-7}$ M + 4.5 mL 0.003 M HCL	$1.8 \times 10^{-8}$ M	$3 \times 10^{-9}$ M
500 $\mu\text{L}$ $6 \times 10^{-8}$ M + 4.5 mL 0.003 M HCL	$6 \times 10^{-9}$ M	$1 \times 10^{-9}$ M
500 $\mu\text{L}$ $6 \times 10^{-9}$ M + 4.5 mL 0.003 M HCL	$6 \times 10^{-10}$ M	$1 \times 10^{-10}$ M
5 mL 0.003 M HCL	0 M	Reference

### Unknown samples

Perform two initial dilutions at 1:10, 1:50 and 1:200 in 0.03M HCl of unknown samples (extracted and stored in 0.1N HCl) of using dilution tube (Fig. 9.)

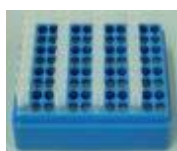


Fig. 9. Dilution tubes

### **Inter-assay calibration standard (QC check):**

A reference standard containing  $1.8 \times 10^{-8}$  M STX ( $3.0 \times 10^{-9}$  M STX in assay) is prepared in advance in 0.003 M hydrochloric acid and kept frozen ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) in 0.5 mL to 1 mL aliquots for long term storage. Aliquots should be thawed and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for routine use (stable up to 1 month) and included undiluted (35  $\mu\text{L}$ ) in each analysis (triplicate wells). This serves as a QC check and confirms day-to-day performance of the assay.

### **Rat brain membrane preparation:**

- Add 2mL thawed rat membrane preparation to 18 mL MOPS, vortex
- Pour diluted prep into empty solvent reservoir

## **4.3.2. Performing the assay**

### **4.3.2.1. Plate setup and incubation**

When possible, use a multichannel pipette to minimize pipetting effort and increase consistency (Fig.10.). Standard curve, QC check, and sample extracts are run in triplicate. Multiple dilutions of sample extracts need to be analyzed in order to obtain a value that falls on the linear part of the competition curve for quantification.

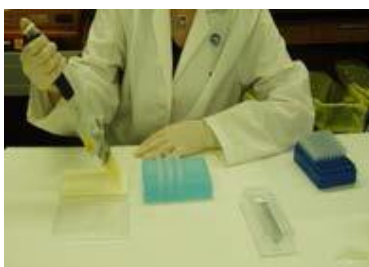


FIG.10. Plate setup using a multichannel pipette

For ease of analysis, it is convenient to use a plate layout which maximizes the number of samples and reference standards that can be analyzed on one plate (a layout example is provided in Fig. 11.) For shellfish extracts, a minimum dilution of 1:10 is used, which

minimizes potential matrix effects while still providing a limit of quantification of approximately 30 µg/kg shellfish:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	QC	QC	QC	U3 1:50	U3 1:50	U3 1:50	U6 1:10	U6 1:10	U6 1:10
B	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	U1 1:10	U1 1:10	U1 1:10	U3 1:200	U3 1:200	U3 1:200	U6 1:50	U6 1:50	U6 1:50
C	3 x 10 <sup>-8</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>	U1 1:50	U1 1:50	U1 1:50	U4 1:10	U4 1:10	U4 1:10	U6 1:200	U6 1:200	U6 1:200
D	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	U1 1:200	U1 1:200	U1 1:200	U4 1:50	U4 1:50	U4 1:50	U7 1:10	U7 1:10	U7 1:10
E	3 x 10 <sup>-9</sup>	3 x 10 <sup>-9</sup>	3 x 10 <sup>-9</sup>	U2 1:10	U2 1:10	U2 1:10	U4 1:200	U4 1:200	U 1:200	U7 1:50	U7 1:50	U7 1:50
F	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	U2 1:50	U2 1:50	U2 1:50	U5 1:10	U5 1:10	U5 1:10	U7 1:200	U7 1:200	U7 1:200
G	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-10</sup>	U2 1:200	U2 1:200	U2 1:200	U5 1:50	U5 1:50	U5 1:50			
H	REF	REF	REF	U3 1:10	U3 1:10	U3 1:10	U5 1:200	U5 1:200	U5 1:200			

U = unknown sample

*Fig.11. Typical 96 well plate layout*

Add in the following order to each of the 96 wells:

-35 µL assay buffer (assay buffer is added first in order to wet the filter membrane)

-35 µL STX standard, QC check, or sample extract

-35 µL [3H] STX

-105 µL membrane preparation

Cover and incubate plate at 40C for 1 hour.

#### 4.3.2.2. Assay Filtration and Counting

##### Assay Filtration

1. Place 96-well plate on the MultiScreen vacuum manifold. Fill empty wells with 200 µL of assay buffer to ensure even filtration across plate

2. Turn on vacuum. Optimum vacuum will pull the wells to dryness in 2-5 sec. Pull contents of all wells through until liquid is removed.

3. With vacuum still running, quickly rinse each well twice with 200  $\mu\text{L}$  ice cold assay buffer using multichannel pipette

### Counting

4. Remove the plastic bottom from the plate. Gently blot the bottom once on absorbent toweling

5. Place microplate in a counting cassette. Seal the bottom of the 96-well plate with sealing tape

6. Add 50  $\mu\text{L}$  scintillation cocktail per well using multichannel pipette

7. Seal top of plate with sealing tape.

8. Allow to sit a minimum of 1 hour at room temperature

9. Tag the plate

10. Count using a microplate scintillation counter

### 4.3.3. Analysis of data

Sample quantification is carried out only on dilutions that fall on the linear part of the competition curve ( $B_i/B_0 = 0.2-0.7$ ). Principles and assay Quality Control acceptance are detailed in the chapter 2.2.3 Analysis of Data, Page 15 of this manual. Where more than one dilution falls on the linear part of the curve, all sample wells corresponding to these dilutions are used to calculate sample concentration. Sample concentration is calculated in  $\mu\text{g}$  STX equivalents/kg shellfish, using the following formula:

$$(\text{nM STX equiv}) \times (\text{sample dilution}) \times \frac{(210 \mu\text{L total volume})}{35 \mu\text{L sample}} = \text{nM STX equiv in extract}$$

$$(\text{nM STX equiv in extract}) \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{372 \text{ ng}}{\text{nmol}} \times \frac{1 \mu\text{g}}{1000 \text{ ng}} = \mu\text{g STX equiv/mL}$$

$$\mu\text{g STX equiv/mL} \times \frac{\text{mL extract}}{\text{g shellfish extracted}} \times \frac{1000\text{g}}{\text{kg}} = \mu\text{g STX equiv/ kg}$$

## 9.5 Anexo 5 “Eliminación de datos anómalos”

### Q Dixon (2 colas)

Valores críticos de $Q$ ( $P = 0.05$ ) para un contraste de dos colas. <b>95%</b>	
<i>Tamaño de muestra</i>	<i>Valor crítico</i>
4	0.831
5	0.717
6	0.621
7	0.570

### G Grubbs (2 colas)

Valores críticos de $G$ ( $P = 0.05$ ) para un contraste de dos colas. <b>95%</b>	
<i>Tamaño de muestra</i>	<i>Valor crítico</i>
3	1.155
4	1.481
5	1.715
6	1.887
7	2.020
8	2.126
9	2.215
10	2.290

## 9.6 Anexo 6 “Abreviaturas”

<b>FAN</b>	Floraciones de algas nocivas
<b>PSP</b>	Intoxicación paralítica por marisco
<b>STX</b>	Saxitoxina
<b>AOAC</b>	Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales
<b>ELISA</b>	Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay
<b>HPLC/MS</b>	Liquidchromatography- massspectrometry
<b>RBA</b>	Receptor BindingAssay
<b>[3H]STX</b>	Saxitoxina marcada con tritio
<b>CONAMAR</b>	Comisión Nacional de Marea Roja de El Salvador
<b>NOAA</b>	<u>National Oceanic and Atmospheric Administration</u>
<b>BCA</b>	ensayo del acidobicinconinico
<b>ISO/IEC 17025</b>	Organización Internacional de Normalización/Comisión Electrotécnica Internacional
<b>MINSAL</b>	Ministerio de Salud
<b>OIEA</b>	Organismo Internacional de Energía Atómica
<b>CTXS</b>	Ciguatoxinas
<b>PbTxS</b>	Brevetoxinas
<b>DA</b>	Ácido domoico
<b>DS</b>	Desviación Estándar