



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DETERMINACION DE LA BREVETOXINA MARINA**

**UTILIZANDO ACEITE DE OLIVO**

**TESIS MANCOMUNADA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A N:**

**SERGIO CARDONA MARTINEZ**

**ALINA GOMEZ VIDALES**



**MEXICO, D. F. 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

**Presidente:** Prof. Pedro Valle Vega

**Vocal** Prof. Francisca Iturbe Chiñas

**Secretario** Prof. Luz Sandra Sánchez Del Ángel

**1er. Suplente** Prof. Amanda Gálvez Mariscal

**2°. Suplente** Prof. Leticia Gil Vieyra

Este tema se desarrollo en Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y en el laboratorio 4-A de la Facultad de Química, UNAM.

**Asesor del tema:** M. C. Luz Sandra Sánchez Del Ángel

**Sustentantes:** Cardona Martínez Sergio

Gómez Vidales Alina

## *Agradecimientos*

Con amor,

*A mis padres*

**Antonio y Virginia**, Agradeciendo su amor y fortaleza, guiándome y apoyándome siempre.

Con cariño,

*A mis hermanos*

**Viky, Julio y Alex**, ejemplos de inteligencia, honestidad y esfuerzo constante.

*Con gratitud,*

A mis amigas de siempre, gracias por su amistad incondicional.

Un agradecimiento especial a:

**M. C. Luz Sandra Sánchez**, por su invaluable apoyo en la elaboración de esta tesis.

*A la UNAM, en la que  
los sueños se cumplen si uno lucha por ellos,  
y los sueños se entrelazan y van formando una vida, mi vida.*

Alina Gómez Vidales

## Agradecimiento

Agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México que alimento y engrandeció mi conocimiento y mi espíritu y a mi familia que es la base del ser humano que soy.

SERGIO CARDONA MARTINEZ

## ***ABREVIATURAS***

UR	Unidad Ratón
g	Gramo
ml	Mililitro
nm	Nanómetro.
t	Tiempo.
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto.
hr	Hora
<	Menor que
meq	miliequivalentes.
N	Concentración Normal
M	Concentración Molar
NSP	Intoxicación Neurotoxica.
PSP	Intoxicación Paralizante.
DSP	Intoxicación Diarreica.
ASP	Intoxicación Amnésica.
° C	Grados Celsius.
MBV	Moluscos bivalvos

---

---

## INDICE

<b>CAPITULO I:</b>	Pág.
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	4
<b>Hipótesis</b> .....	5
<b>Antecedentes</b>	
Generalidades.....	6
Origen y clasificación de los dinoflagelados	9
Aplicación de la veda temporal de moluscos bivalvos.....	11
Toxinas involucradas en la marea roja.....	12
Distribución y efectos de marea roja en México.....	13
Propiedades de la <i>Karenia Brevis</i> .....	18
Características de la brevetoxina	
Estructura.....	20
Toxicidad.....	23
Exposición dérmica.....	23
Exposición oral.....	24
Vectores de intoxicación.....	39
Especies de moluscos bivalvos en el Golfo de México.....	26
Monitoreo de la Brevetoxina.....	27
Métodos de detección de la brevetoxina.....	36
Disponibilidad del aceite de Algodón y Olivo.....	39
<b>CAPITULO II:</b>	
<b>Metodología</b>	
A) Análisis fisicoquímico.....	44
Peso Específico.....	45
Índice de Yodo.....	45
Índice de Saponificación.....	46
Perfil de Ácidos Grasos.....	46
Índice de Refracción.....	47

---

	Pág.
Índice de Peróxidos.....	48
Índice de Kreis.....	49
Índice de Acidez.....	49
B) Ensayo biológico utilizando aceite de algodón y olivo .....	50
C) Protocolo de validación parcial.....	56
<b>CAPITULO III:</b>	
<b>Resultados y Análisis de Resultados.....</b>	<b>78</b>
<b>CAPITULO IV:</b>	
<b>Conclusiones.....</b>	<b>86</b>
<b>CAPITULO V:</b>	
<b>Anexo A</b>	
Definición de bioensayo.....	87
Vía intraperitoneal.....	88
Calidad de los animales para laboratorio.....	89
Definición de cepa.....	91
<b>Anexo B</b>	
Tabla: corrección de peso del ratón.....	91
Tabla: relación de dosis, tiempo de muerte y peso de ratones.....	92
<b>Anexo C</b>	
Materiales y reactivos para el bioensayo.....	93
<b>Anexo D</b>	
Resultados experimentales del bioensayo.....	94
<b>Anexo E</b>	
Cromatograma del aceite de algodón .....	104
Cromatograma del aceite de oliva.....	105
<b>Bibliografía.....</b>	<b>106</b>



## INTRODUCCION

La presencia de la marea roja es un fenómeno natural, el cual es conocido por los pescadores desde siempre como algo que impide comer productos del mar, este se presentaba de manera imprevista y así mismo desaparecía, sin embargo, en las últimas dos décadas tales eventos se han incrementado en frecuencia, intensidad y distribución geográfica.

La marea roja es generada por un gran número de algas microscópicas cuyo crecimiento se encuentra favorecido por factores ambientales y nutrientes orgánicos presentes en el medio marino, así como el movimiento de las aguas (corrientes). Los microorganismos generadores de mareas rojas tóxicas están clasificados dentro de diferentes grupos taxonómicos entre los cuales destacan las diatomeas, cianofilas y dinoflagelados, estos últimos producen la mayor variedad y las sustancias más tóxicas de la marea roja, sin embargo, afortunadamente esto se limita sólo a algunas especies entre las cuales se encuentra *Karenia brevis*, que produce la brevetoxina.<sup>(1)</sup>

Los moluscos bivalvos (ostiones, mejillones y almejas) son los que actúan como vectores de la intoxicación almacenando este toxico lo que puede causar incluso la muerte en el ser humano.<sup>(2)</sup>

Dentro de las principales características de la brevetoxina destacan su liposolubilidad y esta es la base que fundamenta su determinación por medio de un bioensayo en ratón.

La metodología que se sigue comúnmente en México para determinar la presencia de la brevetoxina en los moluscos bivalvos se hace mediante un bioensayo por inoculación intraperitoneal del extracto obtenido de la muestra usando como vehículo el aceite de algodón. En virtud de la poca disponibilidad de este aceite, el objetivo principal del presente estudio es encontrar una alternativa en el aceite de oliva como vehículo de la brevetoxina como único cambio en el bioensayo.

### ***En la presente investigación:***

En el Capítulo I: Se estudiara la definición de marea roja y las toxinas involucradas en este fenómeno natural. La historia, distribución y efectos de marea roja en México.

Se estudiaran las propiedades del dinoflagelado *Karenia Brevis* así como las características de la brevetoxina. Se revisara brevemente otros métodos de detección. Se hará un comparativo de la disponibilidad del aceite de oliva y del aceite de algodón con el fin de fundamentar la sustitución de un reactivo por otro.

Capítulo II: Metodología. Se describe el procedimiento de determinación de la brevetoxina marina mediante el bioensayo de ratones utilizando el aceite de algodón y con el aceite de oliva.

Se evaluarán las características fisicoquímicas del aceite de algodón y aceite de oliva haciendo un comparativo analizando los resultados obtenidos para conocer si puede ser un sustituto aceptable en lugar del aceite de algodón en el bioensayo.

Se realizara un protocolo para evaluar el desempeño del método de prueba alternativo (mismo método al oficial pero con un cambio de reactivo) contra el método de referencia oficial consistente en bioensayo en ratón. El paso metodológico de cambio es la sustitución del aceite de algodón por el aceite de oliva.

Capítulo III: Análisis de Resultados, se analiza la caracterización fisicoquímica experimental que se llevo a cabo del aceite de oliva y se hace una comparación con las características del aceite de algodón.

Capítulo VI: Se ofrecen las conclusiones basadas en el análisis de los resultados experimentales y el planteamiento del procedimiento sobre como realizar la evaluación del desempeño del método de prueba alternativo.

Es importante resaltar la problemática que nos lleva a la sustitución del aceite de algodón por aceite de olivo como vehículo en la inoculación del bioensayo, entre las causas

de ello se encuentra el factor de disponibilidad. Es conocido que aunque México no se encuentra dentro de los principales productores de aceite de olivo comercial, existe una gran demanda de este aceite a nivel mundial y este aspecto favorece la disponibilidad. Sin embargo, el costo del aceite de olivo grado reactivo sobrepasa el del aceite de algodón del mismo grado. Esto debido a que se trata de un producto de importación y por la poca demanda de este producto como grado reactivo trae como consecuencia que su precio sea mas elevado, sin embargo en esta investigación se busca una alternativa al aceite de algodón, el cual cuando llega a escasear lo vuelve crítico en eventos de marea roja.

En virtud de que la densidad del aceite de olivo ( 0.910 g/ml, T= 20 °C ) es similar a la del aceite de algodón ( 0.915 g/ml, T= 20 °C), se realizó el estudio de las demás características fisicoquímicas del aceite de olivo con la intención de utilizarlo como una alternativa para vehiculizar la brevetoxina presuntamente presente en los moluscos bivalvos.

Como parte de la caracterización fisicoquímica, se consideraron varios aspectos como son: la densidad específica, índice de saponificación, índice de yodo, índice refracción, composición de ácidos grasos libres, índice de acidez, índice de peróxidos e índice de Kreis.

Se espera que los resultados demuestren similitud fisicoquímica para con ello contar con una opción mas, al presentarse una contingencia por la presencia de *Karenia brevis* como dinoflagelado predominante en la marea roja.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el aceite de oliva como sustituto del aceite de algodón para utilizarlo como vehículo en la inyección intra peritoneal en la prueba biológica en ratón para detectar y cuantificar la toxina neurotoxica (brevetoxina).

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la brevetoxina marina en moluscos bivalvos provenientes del Golfo de México utilizando aceite de algodón como dicta el método oficial (American Public Health Association, 1970) y alternativamente, aceite de oliva como vehículo de la brevetoxina extraída.
- Plantear el protocolo de validación para la metodología con el uso del aceite de oliva para determinar la brevetoxina marina en moluscos bivalvos como método alternativo al método oficial.

## **HIPOTESIS**

Las características físicas y químicas del aceite de oliva son similares a las del aceite de algodón como disolvente y vehículo en la prueba biológica en ratón y debido a su disponibilidad comercial es un buen sustituto del aceite de algodón para realizar esta prueba.

# ANTECEDENTES

## MAREA ROJA

Durante las dos ultimas décadas se ha escrito mucho acerca de las marea roja. En el pasado, este fenómeno era raro e impredecible, pero en la actualidad es muy común y de cierta temporalidad en determinadas áreas. <sup>(1)</sup>

La marea roja es el producto de la concentración masiva y esporádica de fitoplancton, principalmente de algunas especies de diatomeas del género *Pseudo-nitzchia* y de dinoflagelados de los géneros *Gonyaulax* y *Gymnodinium*, entre otros. Aunque pueden ser frecuentes, en general son impredecibles y de permanencia o duración corta e irregular.

Este fenómeno ocurre cuando interactúan en el medio marino ciertos factores biológicos, antropogénicos y ambientales (físicoquímicos).

Entre los factores biológicos más importantes está la presencia de una población "semilla" de los mencionados organismos del fitoplancton.

Como factor antropogénico destaca de manera específica la contaminación orgánica del mar, la cual incrementa anormalmente la cantidad de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, que en concentraciones mayores a las normales en el sitio específico provocan un aumento en la reproducción del fitoplancton, llamado florecimiento (*blooms*).<sup>(3)</sup> Esto es debido a la eutrofización de las aguas costeras por la actividad humana, permitiendo una selección y estimulación en el crecimiento de algas nocivas y también al transporte de especies nocivas y sus formas quísticas en el agua lastre de los barcos de carga.

Dentro de los factores ambientales se consideran la temperatura, la luz, salinidad, el aporte de nutrientes por parte de la atmósfera y de las aguas intercontinentales y subterráneas.

*La temperatura* es una variable bastante importante que influye en el crecimiento del fitoplancton, varios grupos del fitoplancton como los dinoflagelados tienen una amplia tolerancia a la temperatura.

*La luz* es muy importante para el crecimiento de las algas y con frecuencia es un factor limitante para su desarrollo. La intensidad luminosa disminuye exponencialmente con la profundidad en la columna de agua y una fuerte iluminación puede tener un factor selectivo para desarrollar blooms de algunas especies de algas.

*Salinidad.* Muchas especies de algas son capaces de tolerar amplios rangos de salinidad, es decir son eurihalinos.

*Nutrientes.* Además del carbono, hidrógeno y oxígeno, las algas requieren de 13 a 15 elementos adicionales para crecer y reproducirse. La mayoría de estos nutrientes suelen encontrarse en cantidades suficientes relativas a las necesidades del alga, sin que sean factores limitantes potenciales para el crecimiento.

Las microalgas marinas constituyen la base de la cadena alimenticia, sin embargo, algunas veces las proliferaciones de microalgas en aguas marinas o salobres causan masivas mortandades de peces, alimentos marinos contaminados con toxinas, o alteran ecosistemas.

Dentro de los florecimientos de algas nocivas o Harmful Algal Blooms (HAB) se distinguen dos grupos: las algas productoras de toxinas que pueden contaminar los alimentos marinos y las que pueden matar la fauna marina por las altas biomásas que producen, ocasionando anoxia en el medio donde se desarrollan. <sup>(4)</sup>

Ecológicamente existe una serie de fases o etapas comunes de mareas rojas:

*Fase I de iniciación.* Implica la existencia de un “lecho de quistes” de resistencia en la región del fondo; además, se considera que todos los dinoflagelados de tipo nerítico-esturiano presentan en su ciclo de vida un planocigoto (dinoquiste con movimiento) o hipnocigoto (dinoquiste sin movimiento y cubierta de resistencia), ambos son células 2N. Hay elementos y sustancias que actúan como mecanismos de disparo (Fe, Mn y Vit. B12).

*Fase II de crecimiento.* Es necesaria una división asexual así como las adaptaciones a la luz y los nutrientes que son básicas o esenciales para mantener la población de la marea roja. Debe considerarse que la tasa de crecimiento es “normal” (1 div / día) en la especie dominante de la marea roja.

*Fase III de mantenimiento.* Es la mas conocida por ser la única visible del fenómeno. Aquí es donde se alcanza la máxima densidad de la especie dominante de la marea roja. Durante este momento se presenta una competencia intra específica, en la que intervienen sustancias de efectos antagónicos producidos por las microalgas, adaptaciones a los factores fisicoquímicos y una mejor asimilación de nutrientes o un mayor poder de almacenamiento de sustancias de reserva; así el mejor dotado será el que logre imponer su dominancia.

*Fase IV de terminación.* Esta etapa posiblemente se debe al efecto directo del aumento de la turbulencia sobre el crecimiento celular. Es la menos conocida y parece ser que los mismos factores físicos que la concentran también la abate o la disipan. <sup>(1)</sup>

En esta revisión documental se estudiara en general a la especie de dinoflagelados, así como una visión en general de otras especies que producen toxinas en México, enfocándonos posteriormente al dinoflagelado *Karenia brevis* productor de la brevetoxina, toxina de interés en esta investigación.

## **ORIGEN Y CLASIFICACION DE LOS DINOFLAGELADOS**

Los Dinoflagelados corresponden a un grupo del fitoplancton principalmente marino de carácter cosmopolita cuyo tamaño fluctúa entre 20 y 500  $\mu\text{m}$ , por lo que se les ubica dentro del microplancton. Los dinoflagelados vivientes son protistas, principalmente planctónicos que se mueven en el agua gracias a dos flagelos desiguales y contienen pigmentos rojo-anaranjados. Muchos de ellos contienen cromatóforos fotosintéticos en el protoplasma y celulosa en la pared tecal, por lo que se parecen a los vegetales.



Sin embargo, otras formas son heterotróficas y por su capacidad de desplazamiento se parecen más a los animales. La mayoría se distinguen por la presencia de un núcleo especial que entre otras características tiene cromosomas fibrilares que se mantienen condensados y visibles durante todo el ciclo mitótico. Sus características morfológicas y requerimientos nutritivos los hacen exitosos desde el punto de vista reproductivo y de crecimiento en aguas tropicales, donde la estabilidad en la columna de agua es mayor y la concentración de nutrientes más baja.

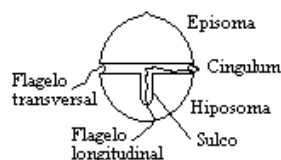
El ciclo vital de muchas especies de dinoflagelados presenta dos estadios principales. Uno móvil en el cual la célula está envuelta en una membrana llamada amphiesma y ocasionalmente por una estructura celulósica llamada Teca, la cual no es fosilizable. En el otro estadio, la célula es inmóvil y se encuentra dentro de un quiste, el cual en ocasiones está hecho de un material proteínico muy resistente que si es fosilizable.

Para la clasificación pueden ser divididos en dos grandes grupos diferenciados por la presencia o ausencia de placas en su amphiesma, por lo que se les denomina Tecados o Atecados respectivamente.

## DINOFLAGELADOS ATECADOS

El estudio paleontológico de este grupo de dinoflagelados es complicado, ya que su condición de organismos desnudos hace difícil su preservación, con la formalina se destruyen o pierden su forma original. Un buen agente para este grupo es la solución de yodo con la que se fijan las muestras para recuento.

Por convención la estructura celular de los atecados se divide en dos regiones una superior: Epicono (o episoma) y una inferior: Hipocono (o hiposoma), ambas separadas por el Cingulum (o cíngulo), que corresponde a un surco transversal que rodea a toda la célula y que aloja al flagelo transversal.



## DINOFLAGELADOS TECADOS

La estructura celular de este grupo se basa también en dos regiones denominadas Epiteca la superior, e Hipoteca la inferior. Al igual que en los atecados, ambas se encuentran separadas por el cingulum, que aloja al flagelo transversal, y en la región ventral de la hipoteca se encuentra en sulcus que aloja al flagelo longitudinal.

Los dinoflagelados tienen una cubierta celular compleja llamada anfiessa, integrada por vesículas planas denominadas alvéolos. En esta especie, éstas se apoyan en placas de celulosa entrelazadas que componen una especie de armadura llamada teca. La teca toma diversas formas y arreglos dependiendo de la etapa del dinoflagelado.

Los dinoflagelados tecados, además de diferenciarse de los atecados por la presencia de placas, también lo hacen porque generalmente la epiteca e hipoteca presentan prolongaciones denominadas Cuernos.

La epiteca se prolonga en un Cuerno Apical, y la hipoteca en dos Cuernos Antapicales, los cuales en algunas especies corresponden a Espinas.



*Ceratium sp.* Con tabulación gonyaulacoide

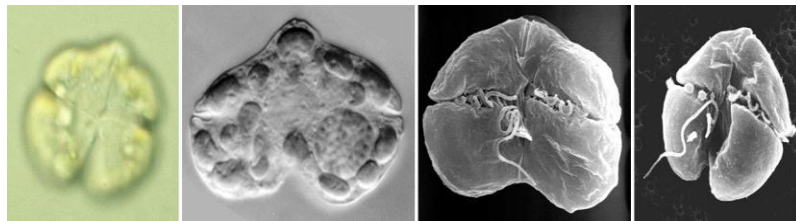
La dirección en que se proyectan los cuernos antapicales puede variar en las diferentes especies, es decir, se pueden disponer hacia arriba, casi paralelos al cuerno apical, o bien hacia abajo. El grupo de los tecados también se caracteriza por la presencia de estructuras accesorias: aleta o expansiones aliformes, espinas, etc. Todas se utilizan como una característica taxonómica.

Las placas de naturaleza celulósica que forman parte de la pared de estos organismos, son consideradas como la característica taxonómica más importante, ya que su forma, número y posición es propia de cada especie.

## TOXICIDAD DE LOS DINOFLAGELADOS

Los dinoflagelados son una vasta división de microalgas, que conforman una fracción importante dentro de los productores primarios de la cadena trófica; son organismos unicelulares eucarióticos, que pueden desarrollarse en forma simbiótica, parasitaria, béntica y/o de vida libre. Estos organismos, presentan una serie de características morfológicas y fisiológicas que les ha permitido adaptarse a distintos hábitat. Dentro de estas características destacan fundamentalmente dos: 1) su capacidad de formar parte de los eventos FAN y 2) su capacidad de producir compuestos bioactivos (toxinas) que pueden alterar los procesos celulares de otros organismos.<sup>(1)</sup>

Hoy en día, el método de monitoreo más ampliamente utilizado es la microscopia de luz, realizado por expertos; esta técnica provee una confirmación visual de la presencia de especies en las muestras de agua y genera un estimado de la abundancia de células. Esta metodología ha sido probada como adecuada para la detección de algas tóxicas.



Micrografía de *K. brevis*

Debido a estas observaciones por expertos se han podido identificar a las especies de algas que producen Florecimientos Algaes Nocivos en los mares mexicanos.

## TOXINAS INVOLUCRADAS EN LA MAREA ROJA EN MEXICO

Actualmente se han identificando muchos tipos de toxinas a partir de los diferentes grupos generadores de mareas rojas, y con la finalidad de simplificar su estudio se han clasificado de acuerdo con el tipo de trastorno que producen en las personas que se intoxican, estos son: la intoxicación paralizante por moluscos (PSP), la intoxicación diarreica por moluscos (DSP), la intoxicación amnésica por moluscos (ASP) y la afectación neurológica por moluscos (NSP). Las toxinas conocidas y químicamente confirmadas que se encuentran en los mares mexicanos y que se presentan con mayor frecuencia se observan en la siguiente tabla: <sup>(1)</sup>

**Tabla 1:** Toxinas que se encuentran en los mares mexicanos. <sup>(5)</sup>

INTOXICACIÓN	TIPO DE TOXINA	ESPECIES	SINTOMATOLOGÍA
<b>PSP</b> o intoxicación paralizante.	Saxitoxina. Neosaxitoxina y otros derivados.	<i>Alexandrium tamarense.</i> <i>Alexandrium catenella.</i> <i>Alexandrium minutum.</i>	Parestesia perioral, procesando a manos y pies, parálisis, sensación de ingravidez. Puede ser mortal.
<b>DSP</b> o intoxicación diarreica.	Ácido Okadaico y otros derivados.	<i>Gymnodinium catenatum.</i> <i>Dinophysis acuminata.</i> <i>Dinophysis acuta, Dinophysis caudata, Dinophysis mitra, Dinophysis norvegica, Dinophysis rotundata, Dinophysis tripos, Dinophysis sacculum, Prorocentrum lima, Prorocentrum delicatissima, Prorocentrum tepsium sp. Indet, Prorocentrum seriata.</i>	Alteraciones digestivas como vómitos, diarreas, dolor abdominal. No hay registrados casos mortales. Promotoras de tumores.
<b>ASP</b> o intoxicación amnésica.	Ácido Domoico.	<i>Pseudonitzschia multiseries,</i> <i>Pseudonitzschia pseudodelicatissima,</i> <i>Pseudonitzschia australis,</i> <i>Pseudonitzschia seriata.</i>	Gastroenteritis y pérdida de memoria. Puede ser mortal.
<b>NSP</b> o intoxicación neurotóxica.	Brevetoxina.	<i>Karenia brevis.</i>	Alteraciones leves de tipo neurológico, de corta duración puede llegar a ser mortales.

## **DISTRIBUCION Y EFECTOS DE MAREA ROJA EN MÉXICO.**

En México, las marea roja no son un fenómeno nuevo y son varias las especies que afectan sus costas. Durante los últimos años, las zonas afectadas por las mareas rojas se han ampliado en el suroeste del Pacífico. No se puede decir lo mismo en áreas del Golfo de California y Golfo de México, ya que estos fenómenos se conocen cuando menos desde hace dos siglos.

### **Golfo de California**

En la región del Golfo de California las mareas rojas son muy comunes, detectándose cerca de siete zonas de mayor frecuencia que son: Mazatlán, Mochis, Topolobampo, Yavaros, Guaymas y la zona norte de la isla Ángel de la Guardia. Se ha determinado que el ciliado *Mesodinium rubrum* es la especie más común en las zonas antes mencionadas. Sin embargo, se detectaron cerca de nueve especies dominantes y secundarias en la Bahía de Mazatlán.

Respecto a los casos de (PSP) por consumo de moluscos bivalvos, únicamente se han presentado en la Bahía de Mazatlán. Aunque se han registrados pocos casos de intoxicaciones y decesos no se descarta la posibilidad de muchos otros que hayan pasado inadvertidos o confundidos con otros tipos de padecimientos debido a que tiene poco tiempo que se toma un registro mas serio de estos sucesos. <sup>(1)</sup>

### **Costa sureste del Pacifico.**

La marea roja era sumamente rara e incluso en algunas áreas desde hace más de 20 años no se tenía conocimiento de ellas. Este evento comenzó a finales de diciembre de 1989 a la altura de la costa de Chiapas y Oaxaca, producidas por *Pyrodinium bahamense*. Esta se puede considerar una nueva zona, debido a la falta de antecedentes; recientemente se han presentado mareas rojas cada año durante el invierno. Otra zona en la que recientemente se han presentado es en la Bahía de Acapulco, cuyos primeros registros no van más allá de veinte años. Uno de los eventos catastrófico de esa zona ocurrió en noviembre de 1995 presentando una duración de 109 días, con 193 intoxicados y 3 decesos, al que se suma una pérdida de cerca de 2000 millones de pesos en la veda de mariscos. El *Pyrodinium bahamensi*

var. *compressum* fue el responsable de los envenenamientos y también de la mortalidad de peces y tortugas. <sup>(4)</sup>

### **Mar Caribe**

En los últimos años se ha presentado en el Mar Caribe eventos de marea roja, principalmente en Yucatán en el año del 2003 particularmente en el Puerto de Dzilam por la presencia de la Diatomea: *Pseudo-nitzschia delicatissima* la toxina que produjo fue el *Ácido Domoico* (ASP); *Dinoflagelados: Scripsiella trochoidea* toxina producida Ictiotóxica; *Prorocentrum lima* produjo la toxina *Ácido Okadaico* (DSP) y *Karenia Brevis* que produjo la toxina *Brevetoxina* (NSP), debido a la implementación oportuna de la veda sanitaria no se presentaron defunciones ni intoxicaciones.

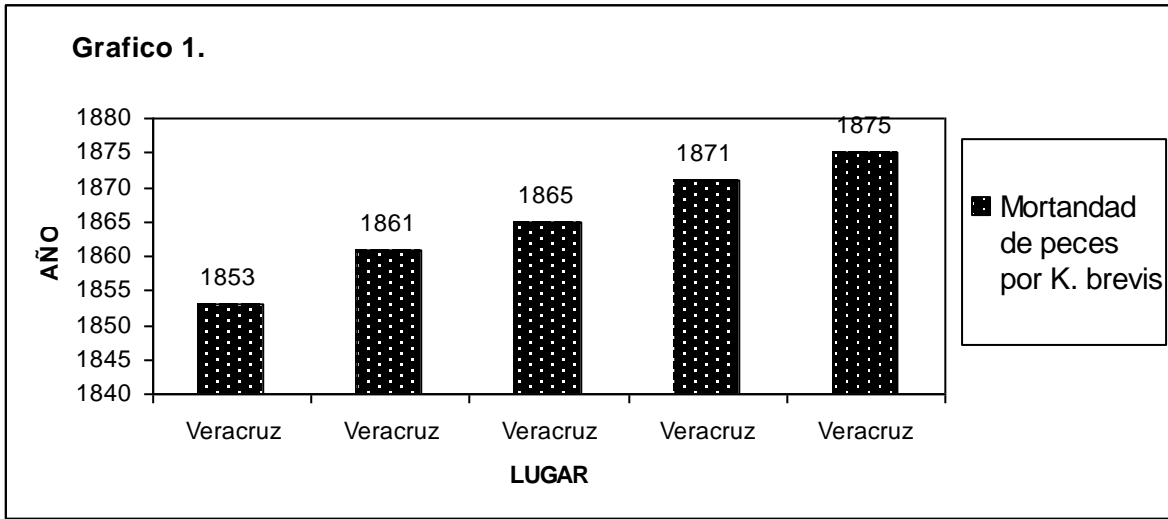
En el año 2008 se presentó otro evento de marea roja en Río Lagartos en Yucatán debido a *Ginardia striata* fue un florecimiento no tóxico y no se implementó veda. En Miramar y Pico de Oro, Centla, Tabasco se presentó en mayo del 2008 evento de marea roja debido a *Karenia brevis* produciendo la *brevetoxina* afortunadamente no se registraron defunciones ni intoxicados. <sup>(6)</sup>

### **Golfo de México**

En Veracruz se encuentran registros, caracterizados por grandes mortandades de peces y decesos humanos desde 1797. El periodo más intenso fue en los años de 1853 a 1875. Posteriormente el único reporte en esta zona se debe a Ramírez Granados, 1963, quien determinó, que el microorganismo más común en el área es *Karenia brevis*. A inicios del 2002 se presentó la marea roja por *Karenia brevis* con duración de dos meses que abarcó casi todo el Golfo de México. Fue cuando se puso en vigor la norma de emergencia NOM-EM-005-SSA1-2001 por la contingencia que produjo la marea roja en México.

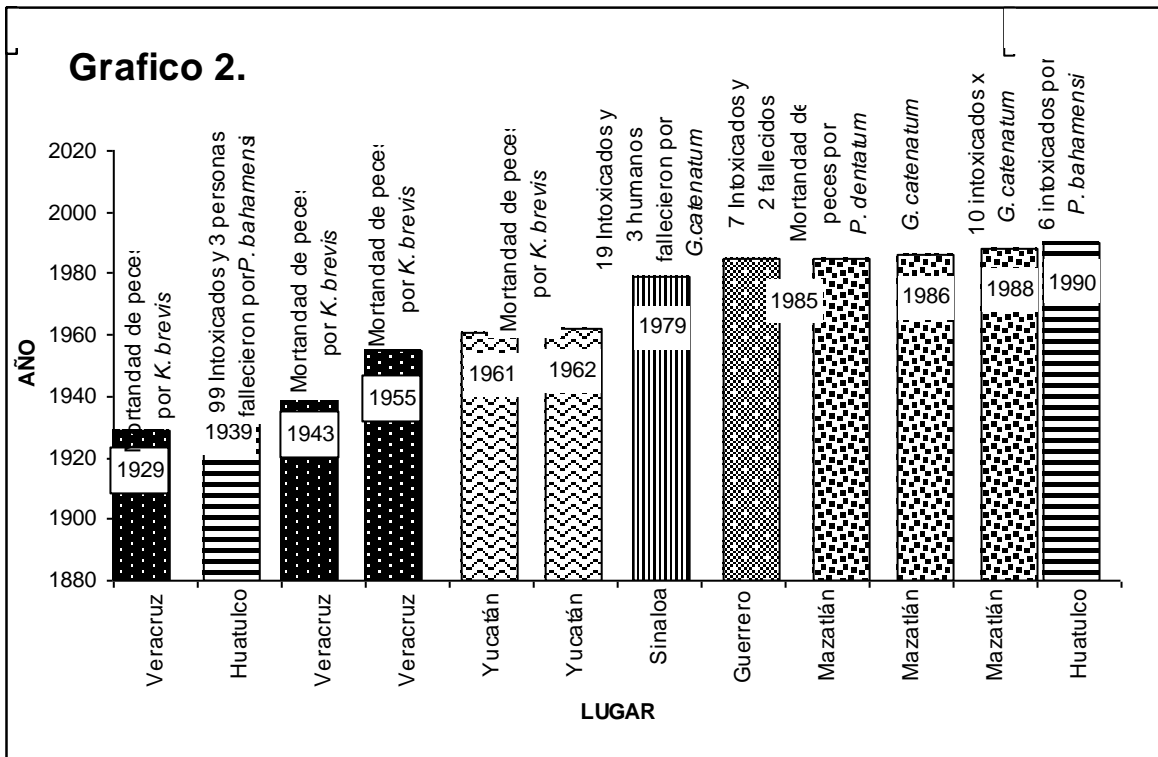
En las gráficas 1 a la 4 se muestran los eventos por marea, sin embargo se debe tener en cuenta que muchos casos no han sido registrados propiamente, además estos fenómenos tienden a incrementarse en forma paulatina y principalmente en las zonas turísticas o de intensa labor acuacultura.

En las siguientes graficas se muestra el registro de intoxicaciones ocurridas en México hasta el año 2009.



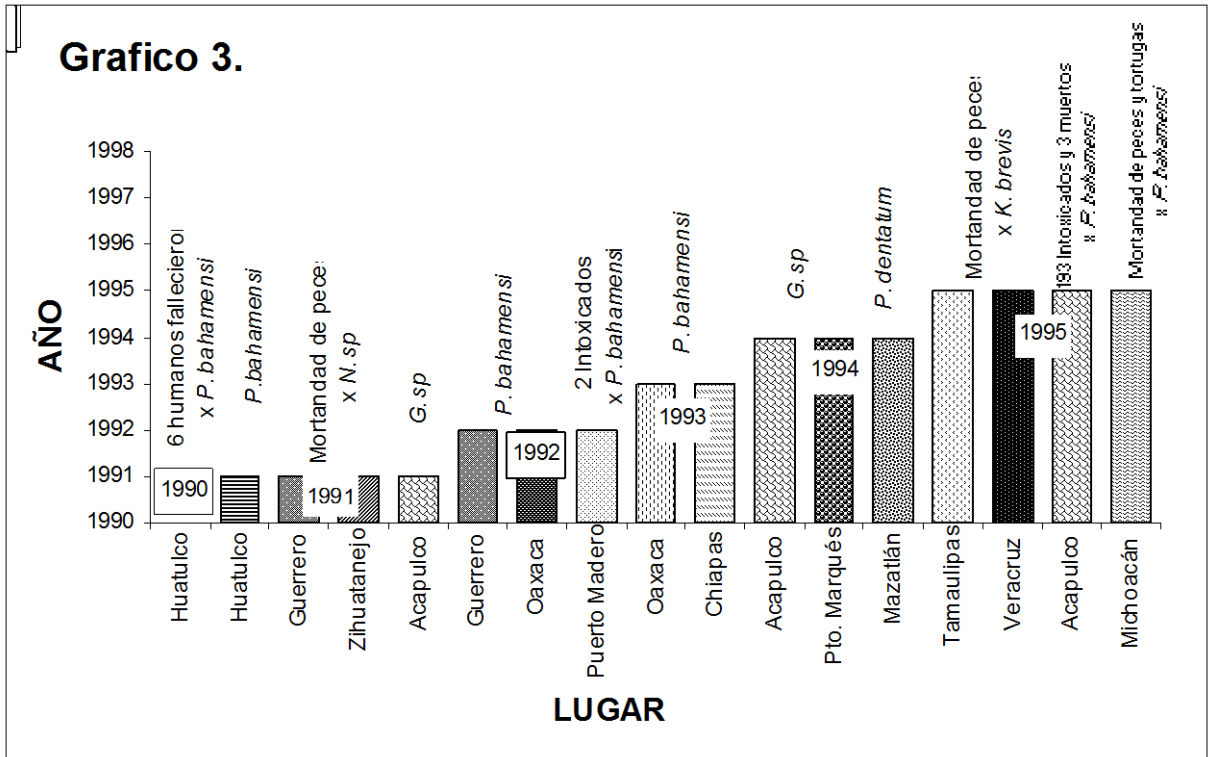
<sup>(1)</sup>Fuente: R. Cortes 1998

**Grafico 1.** En Veracruz existen los registros mas antiguos de mortandad de peces principalmente causados por *K. Brevis*. <sup>(1)</sup>



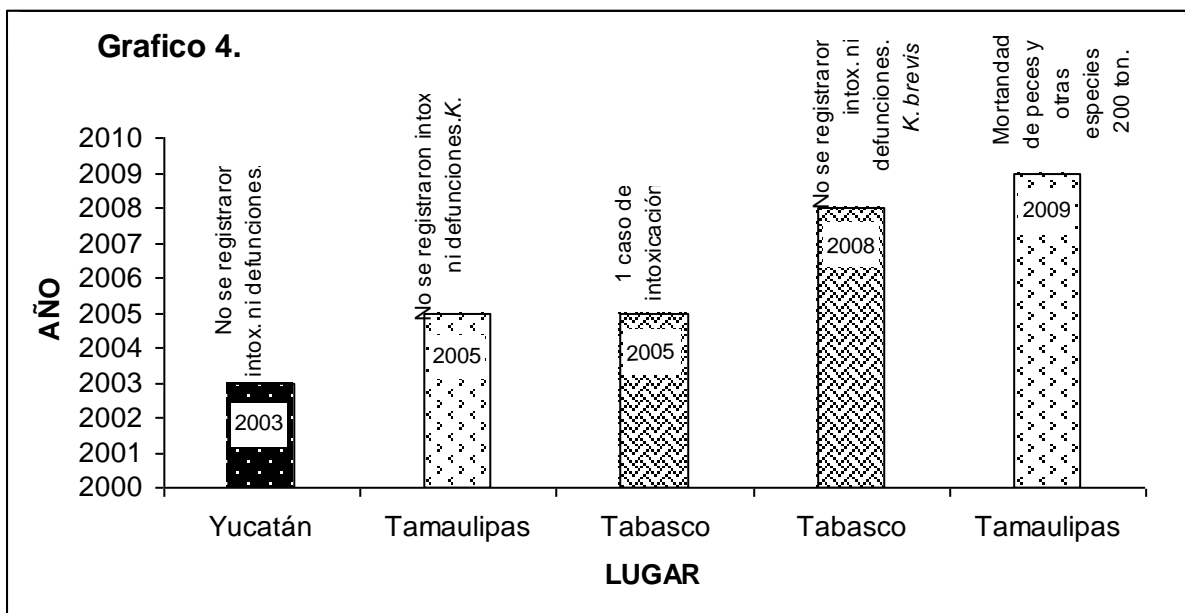
<sup>(1)</sup>Fuente: R. Cortes 1998

**Grafico 2.** En este grafico se observan registros de mortandad de peces, intoxicaciones y fallecimientos de personas por diferentes dinoflagelados. <sup>(1)</sup>



<sup>(1)</sup>Fuente: R. Cortes 1998

**Grafico 3.** Se muestra una variedad de intoxicaciones por diferentes especies y se puede observar la presencia del dinoflagelado *K. Brevis* en el Golfo de México.



Fuente: <sup>(6)</sup> Cofepis 2010

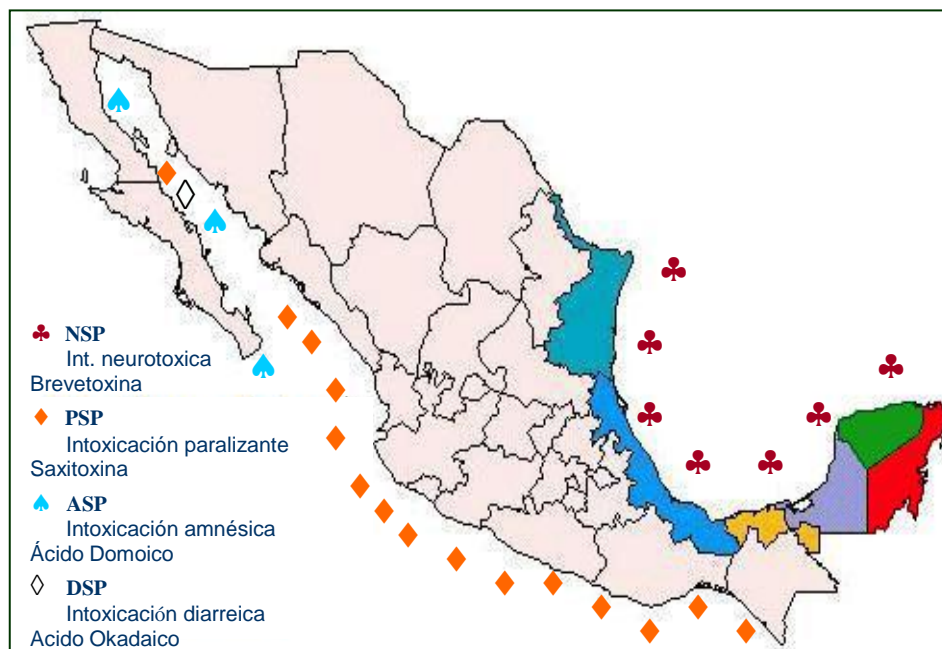
**Grafico 4.** En la ultima década solo se detecto 1 caso de intoxicación a humanos pero si se reportaron perdidas económicas a causa de *K. brevis*.



En la Fig. 1 Se puede observar la distribución de las toxinas en la costa de la República Mexicana.

En el océano pacifico predomina la existencia de la saxitoxina causante de PSP y en menor grado el ácido domoico (ASP) y el ácido okadaico (DSP), esto se debe a las corrientes marítimas provenientes del sur.

Por lo que respecta al Golfo de México la incidencia de intoxicación (NSP) es principalmente causada por la Brevetoxina. <sup>(1)</sup>



**Fig. 1** Distribución de toxinas en México

Tomando en consideración el gran riesgo para la salud publica que representan los envenenamientos por la biotoxina marina (*Karenia brevis*) cuando los organismos acuáticos han estado expuestos a marea roja, así como el impacto socioeconómico que resulta de la presencia de este fenómeno y sus efectos en la industria pesquera y el turismo, así como a la población en general; es necesario conocer sus propiedades y sintomatología.

## PROPIEDADES DE KARENIA BREVIS

Dinoflagelado también llamado:

*Gymnodinium breve*, *Ptychodiscus brevis*

### Clasificación

División: Dinophyta

Clase: Dinophyceae

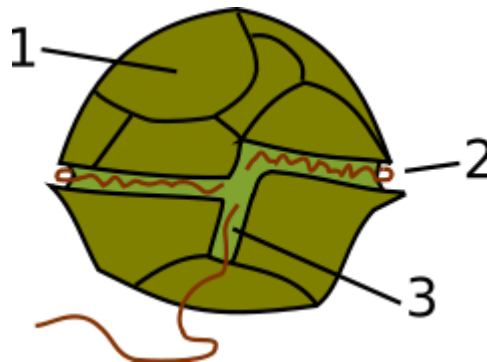
Orden: Gymnodiniales

Familia: Gymnodiniaceae

Género: *Gymnodinium*

Especie: *breve*

### Descripción



**Fig. 2** Estructura de un dinoflagelado: 1-placa atecada, 2-cíngulo con el flagelo transversal, 3-sulcus con el flagelo longitudinal.

*K. brevis* es un organismo "desnudo" (atecado) desprovisto de caparazón externa de placas de polisacáridos como otros dinoflagelados, esto lo hace tener cierta fragilidad.

El rasgo más característico de los dinoflagelados es la presencia de dos flagelos disimilares que proporcionan a los dinoflagelados unos movimientos característicos.

Uno de ellos forma un círculo lateral y se denomina flagelo transversal, mientras que el otro se extiende hacia abajo y se denomina flagelo longitudinal. En esta especie este flagelo se aloja en ranuras, denominados cíngulo, la transversal y sulcus, la longitudinal.

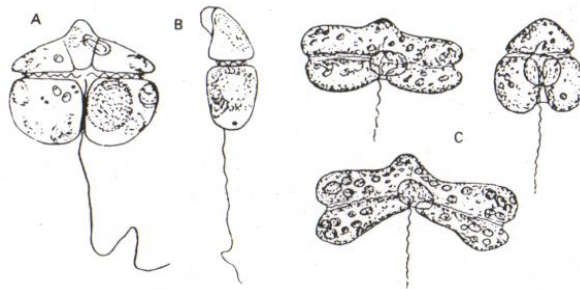
El flagelo transversal proporciona la mayor parte de la fuerza que propulsa la célula e imparte a menudo un movimiento giratorio distintivo, de donde procede el nombre dinoflagelado (del griego, dinos, girando).

El flagelo longitudinal funciona principalmente como timón, aunque también produce una cierta fuerza propulsora.

La célula de los dinoflagelados contiene los orgánulos más comunes tales como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias, gránulos de lípidos y almidón y vacuolas endoplasmáticas. Además, se han encontrado algunos orgánulos sensibles a la luz (les permiten determinar la dirección e intensidad de la luz) y núcleos más grandes de lo usual que contienen un nucleolo prominente. Muchos disponen de tricocistos que disparan filamentos mucilaginosos. <sup>(7)</sup>

Tiene una medida de 18-28  $\mu\text{m}$  de largo y 30-40  $\mu\text{m}$  de ancho.

En la fig. 3 se puede observar su morfología y algunas formas atípicas. *K. Brevis*. Este dinoflagelado ha sido asociado en muertes masivas de peces y elevada mortalidad de mamíferos marinos, y también es conocido por irritación de ojos y vías respiratorias en humanos y animales expuestos a la brisa cuando hay marea roja. <sup>(1,8)</sup>

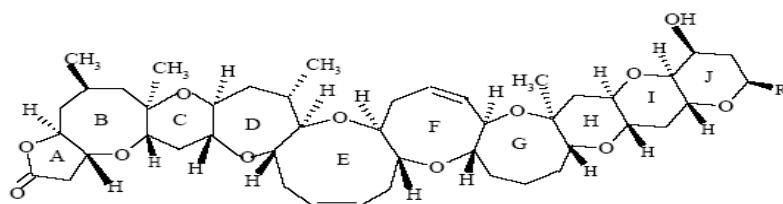


**Fig. 3** *Karenia brevis*: A) Vista ventral que muestra su núcleo excéntrico, y sin desplazamiento singular; B) Vista lateral; C) Algunas formas atípicas. <sup>(1)</sup>

Se le adjudica la producción de neurotoxina (brevetoxina), que produce el envenenamiento neurotóxico por consumo de mariscos, NSP. Causante de grandes mortandades de peces en el Golfo de México.

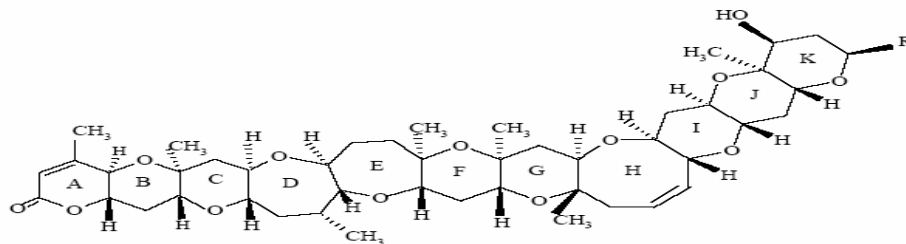
## CARACTERISTICAS DE LA BREVETOXINA

### ESTRUCTURA



**Brevetoxinas Tipo 1 (A):**

PbTx-1,	R = CH <sub>2</sub> C(=CH <sub>2</sub> )CHO
PbTx-7,	R = CH <sub>2</sub> C(=CH <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> OH
PbTx-10,	R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH



**Brevetoxinas Tipo 1 (B):**

PbTx-2	R = CH <sub>2</sub> C(=CH <sub>2</sub> )CHO
oxidada PbTx-2	R = CH <sub>2</sub> C(=CH <sub>2</sub> )COOH
PbTx-3	R = CH <sub>2</sub> C(=CH <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> OH
PbTx-8	R = CH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub> Cl
PbTx-9	R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH
PbTx-5	anillo-K acetato de PbTx-2
PbTx-6	anillo-H epóxido de PbTx-2

**Fig. 4** Estructura de la Brevetoxina

Las PbTxs (*Ptychodiscus brevis*) Fig. 4 incluye un grupo de nueve ficotoxinas compuestas de 2 tipos de estructuras de poliéteres policíclicos de 42 a 47 átomos de carbono.

Tipo 1: (brevetoxina A): PbTx-1, PbTx-7, PbTx-10.

Tipo 2: (brevetoxina B): PbTx-2, PbTx-3, PbTx-5, PbTx-6, PbTx-8, PbTx-9. <sup>(9)</sup>

La solubilidad en lípidos de la brevetoxina es una característica que la hace que se aloje en la parte lipídica del molusco y esto no provoca ningún cambio organoléptico en los moluscos, que al ser consumido por el ser humano se manifiesta por alteraciones leves de tipo

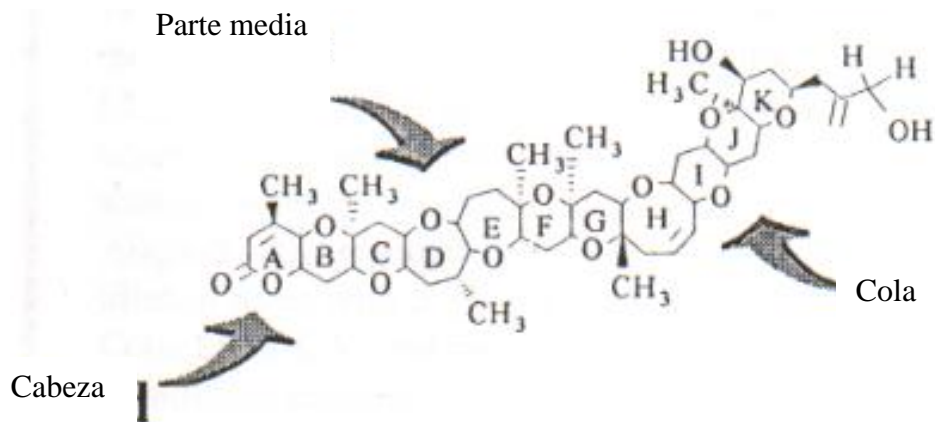
neurológico de corta duración, la persona parece que esta tambaleante y sin poder coordinar adecuadamente las palabras, otra toxina que frecuentemente esta involucrada en la marea roja es la saxitoxina y dentro de sus características se encuentra que es hidrosoluble, estable en soluciones ácidas. En la siguiente tabla se muestran la Dosis Letal media de toxinas involucradas en la marea roja.

**Tabla 2.** Comparación de la dosis letal de diferentes toxinas de la marea roja.

<b>Toxina</b>	<b>Animal de prueba</b>	<b>Cantidad Letal* <sup>(10)</sup></b>
Brevetoxina A PbTx-1	ratones	<b>LD<sub>50</sub> : 180 µg/ kg *</b> intraperitonealmente
Saxitoxina	ratones	<b>LD<sub>50</sub> : 10 µg/ kg*</b> intraperitonealmente.
Ácido Okadaico	ratones	<b>LD<sub>50</sub> : 192 µg/ kg*</b> intraperitonealmente.

Para que un valor de LD<sub>50</sub> se pueda comparar se tienen que tener condiciones fundamentales como son que se trate de la misma especie animal en la que se evalúe el toxico, y que la vía de administración sea la misma, es por ello que haciendo la comparación de las tres toxinas marinas antes mencionadas la que representa un rápido efecto y con una menor cantidad de toxina se encuentra la saxitoxina que paraliza el sistema respiratorio sobreviniendo la muerte rápidamente.

En cuanto a la brevetoxina el grupo A es el que se encuentra en mayor proporción pero el grupo B de brevetoxina en especial el PbTx-2 es el mas lipofílico lo que hace que sea más potente. Este factor es muy importante ya que para que un agente xenobiótico pueda atravesar la membrana celular es por su hidrofobicidad, y más específicamente del coeficiente de partición lípido/agua; o sea, que a medida que el agente xenobiótico tenga un mayor grado de liposolubilidad, será más fácil que atraviere la membrana celular.<sup>(36)</sup>



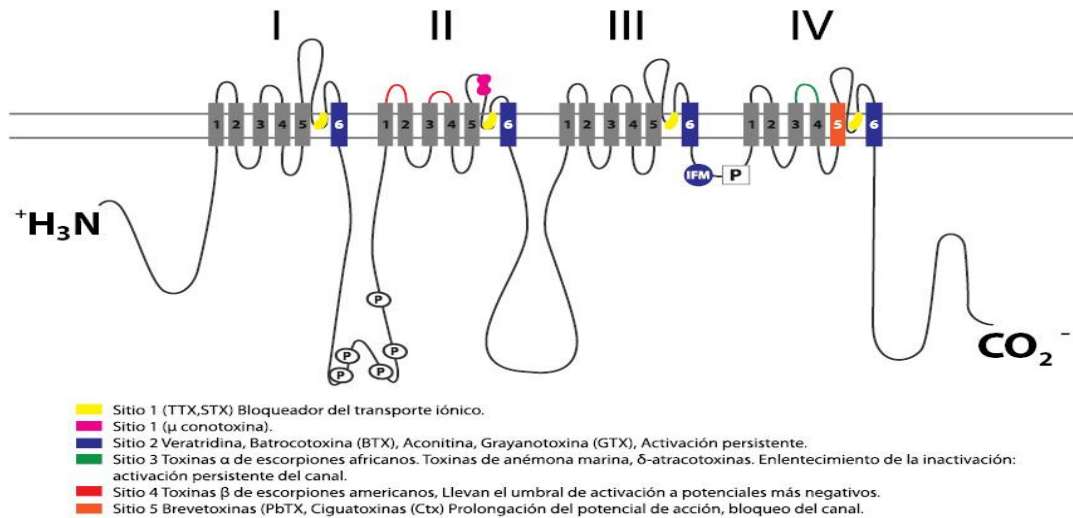
**Fig. 5** Partes principales de la estructura de la brevetoxina.

La Fig.5 muestra tres partes principales en su estructura que son: cabeza, cola y parte media de la Brevetoxina b (PbTx-2). Estudiando la farmacología molecular, el anillo A lactona ha sido descrito como la porción activa de la molécula de la toxina. Los anillos H-I-J-K son la sección rígida de la molécula, la sección de la cola es esencial cuando hace contacto la toxina con el canal de sodio S5 y S6 péptido extracelular en dominio 4. <sup>(11)</sup>

El sitio 5 es un dominio hidrofóbico del canal, la brevetoxina como neurotóxico se une específicamente con gran afinidad a los receptores de acetilcolina <sup>(12)</sup>. Además se sugiere que el bloqueo de la brevetoxina en algunos sitios receptores de acetilcolina es un efecto no competitivo <sup>(13)</sup>. Por lo que la toxina induce una excitación larga y duradera en el canal de sodio. <sup>(9)</sup> Lo que causa un incremento en el flujo de iones sodio al interior de la célula así que la toxina hiperactiva el canal e inhibe el cierre del mismo. El nervio y la membrana del músculo se despolarizan y el resto del músculo se mantiene contraído. <sup>(14)</sup>

La PbTx-3 induce estados de preapertura, haciendo parecer como si el canal tuviera diferentes estados de apertura.

Experimentos de fijación de voltaje han mostrado que las toxinas PbTx 2 y 3 provocan que el umbral de activación se mueva a potenciales hiperpolarizantes, con cinéticas extremadamente lentas.



**Fig. 6** Sitios receptores de toxinas marinas en la membrana de la célula.

La brevetoxina y las ciguatoxinas se unen al sitio receptor 5, interactuando con los segmentos transmembranales IS6 y IVS5.

## TOXICIDAD

En general, las toxinas de alimentos de origen marino tienen una tolerancia de cero, cualquier concentración detectable se considera una causa de acción reguladora.<sup>(8)</sup>

La toxicidad en humanos se puede llevar de dos maneras distintas: por exposición dérmica y por exposición oral.

### Exposición dérmica

Por su fragilidad relativa el organismo *K. brevis* se abre fácilmente por acción del mar liberando las toxinas ya que es desprovisto de caparazón externo de placas de polisacáridos como otros dinoflagelados. Si se nada en contacto directo con floraciones tóxicas, puede causar irritaciones de los ojos y membranas nasales. También puede ocurrir exposición por inhalación a las brevetoxinas resultante en dificultades respiratorias, así como irritación de las membranas nasal y de los ojos por la fragilidad relativa del organismo.<sup>(15,16,17)</sup>

## **Síntomas de intoxicación dérmica**

Las toxinas NSP estimulan fibras colinérgicas post-gangliónicas lo que puede resultar, por exposición a agua de mar en aerosol o a sus mareas rojas, en irritaciones respiratorias y conjuntivales, catarros con copiosos exudados, rinorea, toses no productivas, y broncoconstricción. Algunas personas informan de otros síntomas como mareos, visión en túnel y sarpullidos de la piel. La marea roja aerosolizada puede producir irritación respiratoria consistente en conjuntivitis, rinorrea, tos seca y bronco constricción. <sup>(18)</sup>

La irritación y la bronco constricción en las poblaciones es rápidamente reversibles al abandonar las playas o al permanecer en zonas con aire acondicionado. Los asmáticos parecen ser, particularmente susceptibles. Además, hay informes de enfermedades pulmonares prolongadas, especialmente en poblaciones susceptibles como ancianos o personas con enfermedades pulmonares crónicas. <sup>(16,19)</sup>

## **Exposición oral**

La toxina no afecta la fisiología y apariencia de los moluscos, no hay características distinguibles entre moluscos contaminados de los que no están por lo que su apariencia no sirve de guía a las personas que las colectan y / o las consumen.

## **Vectores de intoxicación**

### **Moluscos bivalvos**

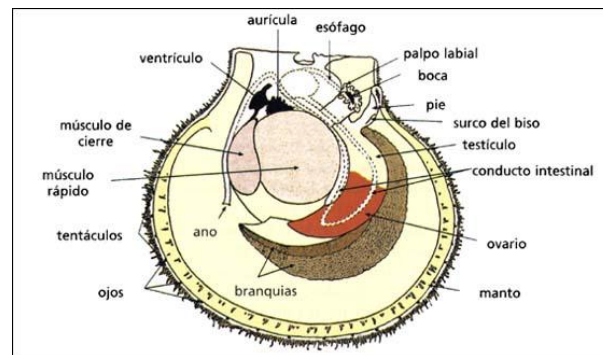
#### **Alimentación**

Los bivalvos filtran su alimento, principalmente organismos vegetales microscópicos llamados fitoplancton. En los juveniles y adultos, los ctenidios, o branquias, están bien desarrollados y ejercen la doble función de alimentación y respiración. Los ctenidios están cubiertos de cilios -diminutos filamentos vibradores- cuyos latidos concertados, y a menudo coordinados, inducen una corriente de agua. Cuando descansan o se encuentran en un sustrato, el animal absorbe el agua a través de la abertura o sifón inhalante, que pasa por las branquias y luego vuelve al medio a través de la abertura o sifón exhalante. Las branquias recogen plancton y lo pegan a la mucosa. Gracias al latido de los cilios, los filamentos de mucosa cargados de alimento pasan por unos surcos especiales en las branquias hacia el



interior hasta los palpos labiales que dirigen el alimento a la boca y lo introducen. Los bivalvos pueden seleccionar parte del alimento y periódicamente los palpos rechazan pequeñas masas de alimento, las pseudoheces, expulsándolas de la cavidad paleal, a menudo por un batido vigoroso de las valvas.

El alimento óptimo de los bivalvos sigue siendo una incógnita pero indudablemente el fitoplancton constituye la parte principal de la dieta. Otras fuentes de alimentación pueden ser importantes, como las finas partículas de materia orgánica muerta con bacterias asociadas y materia orgánica disuelta.



**Fig. 7 :** Anatomía del tejido blando interno de una vieira.

Los moluscos que actúan como vectores de la intoxicación con brevetoxina son principalmente los que se alimentan filtrando el agua e ingieren grandes cantidades de organismos del plancton tóxico. Grandes cantidades de la toxina paralizante se concentran en las glándulas digestivas, la causa de esto es que la brevetoxina es liposoluble y se aloja en la parte lipídica de los moluscos filtradores (mejillones, almejas, ostras y otros) no existiendo ningún cambio perceptivo en ellos ni en su apariencia, ni en el olor, ni en su fisiología esto es debido a que como se menciono esta toxina actúa sobre el canal de sodio de los organismos despolarizándolo y los moluscos principalmente su función es a través de los canales de calcio es por ello que no les causa daño en su funcionamiento, caso contrario cuando el hombre las ingiere le causa molestias de salud e incluso la muerte. <sup>(2)</sup>

## ESPECIES DE MOLUSCOS BIVALVOS EN EL GOLFO DE MEXICO

Los principales moluscos bivalvos que se encuentran en el golfo de México son los siguientes, algunos sirven como bioindicadores de la calidad de agua en los litorales mexicanos, además de servir como alimento para los habitantes de esa zona y para exportación.

**Tabla 3.** Principales moluscos bivalvos que se encuentran en el Golfo de México.

Molusco Bivalvo	Características	
<i>Dreissena polymorpha</i>		Especie originaria del Mar Caspio que por su alta capacidad filtradora remueve una considerable porción del fitoplancton del agua.
<i>Mytilopsis sallei</i>		Por su naturaleza eurihalina esta presente todo el año. Al parecer los factores que pueden ser limitantes en el crecimiento y desarrollo de las poblaciones de M. Sallei pueden ser los aportes de agua dulce, la alta depredación y la limitada disponibilidad de sustratos duros.
<i>Cassostrea gigas</i>		Tiene un potencial de rápido crecimiento y gran tolerancia a las condiciones ambientales, este ostión es originario de Japón. El rango salino óptimo es de entre 20 y 25%. También es altamente tolerante a un amplio rango de temperaturas que va desde -1,8 a 35 °C.
<i>Tapes pullastra</i>		Almejas babosa o chocha. Esta almeja es normalmente de color gris pálido o crema, con unas bandas tenues de una tonalidad más intensa y unas finas líneas que se dibujan en su concha, paralelas al borde. Los sifones están unidos en toda su longitud, siendo esta característica la que nos permitirá diferenciarla de otras almejas.
Almeja Fina		La almeja fina es un bivalvo de extraordinaria calidad. Su color, entre blanco y castaño, varía dependiendo de la zona de producción. Sus sifones son largos y están separados en toda su longitud. Aguanta viva fuera del agua mucho más tiempo que otras almejas.
Almeja Japónica		Esta almeja tiene sus líneas muy marcadas, formando cuadrículas al cruzarse, mucho más marcadas que en la almeja fina. Sus sifones están unidos hasta la mitad de su longitud y el color de su concha varía entre tostado, gris y negro. Su crecimiento es muy rápido,
<i>Tapes rhomboideus</i>		Almeja rubia, El color de sus valvas varía del blanco amarillento al marrón y suele presentar dibujos en toda la superficie. Apreciada comercialmente, aunque de consumo más en Tabasco principalmente.

Los moluscos bivalvos pueden servir como bioindicadores de la inocuidad del agua de mar, además de que se alimentan principalmente del fitoplancton, lo que los hace un vehículo de intoxicación por biotoxinas marinas.

### **Síntomas de intoxicación oral**

Los síntomas de NSP aparecen entre los 30 minutos y las tres horas.

La ingestión de moluscos contaminados ocasiona, en los casos leves, sensación de hormigueo o insensibilidad en los labios, cara y nuca, dolor de cabeza, vértigos y náuseas.

En los casos de gravedad intermedia la intoxicación cursa con rigidez o parálisis de los miembros, sensación de luminosidad, debilitamiento general, taquicardia y ligera dificultad respiratoria.

La intoxicación aguda se manifiesta con parálisis muscular, dificultad respiratoria pronunciada y muerte en 24 horas.

Frecuentemente la intoxicación no es bien diagnosticada ya que la sintomatología es frecuentemente interpretada como un estado de embriaguez. <sup>(2,20)</sup>

Los síntomas de intoxicación en humanos varían según la toxina a la que se exponen, su concentración y la susceptibilidad individual, siendo ésta mayor en los niños, en los adultos mayores y en aquellos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma.

No existe antídoto para la brevetoxina, el tratamiento inmediato puede ser la inducción al vómito, vaciamiento gástrico y el enema que puede reducir o prevenir la posterior absorción de la toxina.

## MONITOREO DE LA BREVETOXINA

Tomando en consideración el riesgo que para la salud de la población representa la exposición a fenómenos de Florecimiento de Algas Nocivas es necesario aplicar medidas tendientes a proteger a la población y prevenir los casos de irritación de ojos y mucosas por contacto de agua de mar (efecto aerosol) o intoxicación por biotoxinas marinas debido al consumo de producto contaminado.

En este apartado se estudian los programas que se aplican cuando se presenta un Florecimiento Algal Nocivo en México.

### a) Aplicación de la veda temporal de moluscos bivalvos

Cuando existe el riesgo de que se presente intoxicación por moluscos bivalvos debe de aplicarse la veda temporal de moluscos y esta contingencia de Marea Roja presenta cuatro niveles.

**1er. Nivel.-** localización del lugar y dimensiones del mismo.

**2do. Nivel.-** muestreo de agua (colecta fitoplanctonica).

Se realiza la identificación de la especie, para conocer si es toxica o no.

Se determina la cantidad de organismos encontrados en un mililitro de agua.

I. Resultados mayores a 5 organismos (células) por ml. Es positivo.

II. Resultados con menos de 5 organismos (células) por ml es negativo.

**3er. Nivel.-** permanencia de células en días.

I. Si la presencia es menor a una semana no representa peligro.

II. Si la presencia es mayor a una semana hay riesgo (monitoreo).

**4to. Nivel.-** Cuantificación de toxinas mediante análisis de laboratorio.

### **Referente a la muestra**

Si al ocurrir un florecimiento algal nocivo, no se encuentra disponible la especie de molusco definido como especie centinela en el Programa de Muestreo Rutinario, se muestreará la especie de molusco que se encuentre disponible y pueda ser muestreada para realizar los análisis.

La muestra de moluscos proveniente de los puntos de muestreo o zonas de extracción silvestre deberá ser conservada en refrigeración desde su recolección en un recipiente adiabático con gel previamente congelado o hielo seco, evitando el contacto directo de los organismos con el hielo, manteniéndose a una temperatura entre cero y 7 °C hasta la recepción en el laboratorio. Las muestras deben analizarse en un plazo no mayor de 48 horas posteriores a su recolección.

### **Envío de muestras.**

Para el envío de muestras al laboratorio es necesario que la muestra, además de las etiquetas de identificación sea acompañada de un oficio solicitando la determinación de la biotoxina correspondiente y de las circunstancias en las que fue tomada la muestra (evento de florecimiento de algas nocivas o Marea Roja).

En el monitoreo de toxinas, en específico para la brevetoxina, la fase de precontingencia inicia cuando al menos una mezcla rebasa los niveles de concentración de 10 UR/100g de carne. Siendo que una Unidad Ratón (UR) se define como la cantidad de toxina que mata a un ratón en un intervalo de 15 minutos, y se expresa en términos de UR/100 g de carne de molusco bivalvo. <sup>(18)</sup>

Si es mayor a 20 UR, se ha demostrado experimentalmente que es el límite inferior de sensibilidad del método que puede causar la muerte de los ratones y que causa intoxicación en el ser humano por lo tanto debe establecerse la veda temporal en moluscos bivalvos y la difusión a la población. Este resultado del análisis está basado por el tiempo de reacción a la toxina en el roedor. <sup>(5, 18)</sup>

## b) Programa Emergente ante un FAN

Cuando derivado del muestreo, se rebasen los límites y criterios establecidos en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Limite máximo permisible <sup>(18)</sup>

TOXINA O PLANCTON	LIMITE MÁXIMO PERMISIBLE
Brevetoxina	20 UR/100 g de carne
Fitoplancton en agua de mar	5,000 cel / L

Se procederá a intensificar el muestreo de acuerdo a lo señalado en la siguiente tabla. La frecuencia de muestreos para la determinación de biotoxinas marinas o de células de fitoplancton no deberá ser inferior a lo señalado en la tabla 4.

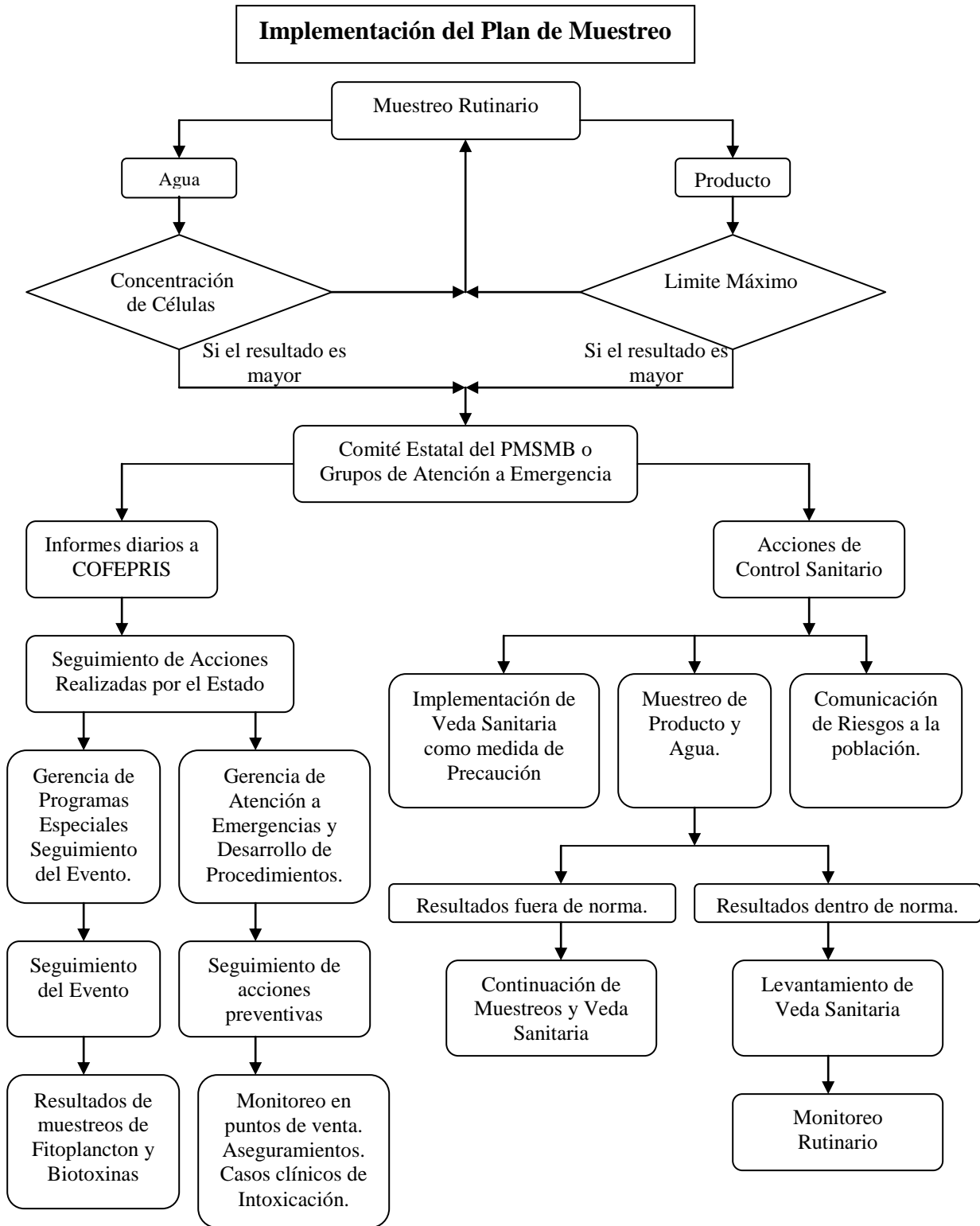
**Tabla 5.** Frecuencia de muestreo frente a un FAN<sup>(18)</sup>

	FITOPLANCTON CUANTITATIVO	PRODUCTO
Áreas silvestres y de cultivo	Cada 4 días	Cada 4 días

Frente a una FAN, las Direcciones de Regulación Sanitaria de las entidades federativas afectadas enviarán diariamente por cualquier medio, a la Gerencia de Seguimiento de Programas (GSP) un informe concentrando de las acciones preventivas implementadas por las Instituciones Estatales involucradas o por las participantes en el Comité Estatal del PMSMB.

En el siguiente diagrama se resume las acciones a seguir cuando se presenta un FAN por brevetoxina.<sup>(6)</sup>

**Diagrama 1.** Implementación del plan de muestreo cuando se presenta un FAN.



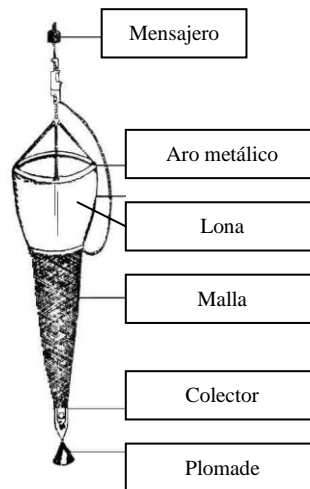
### c) Monitoreo de agua para cuenta de células de Dinoflagelados.

Una forma de conocer si hay marea roja aunque no se note visualmente en la coloración del mar, es mediante el monitoreo del agua de mar. Existen procedimientos que laboratorios certificados llevan a cabo para determinar si la cantidad de células de fitoplancton excede los límites permitidos.

Existen dos tipos de monitoreo de agua de mar para células de dinoflagelados, que son:

- I) Método de colecta cualitativo, y
- II) Método de colecta cuantitativo.

I) El Método de colecta cualitativo, se caracteriza por llevarse a cabo sin el uso de embarcaciones, colecta desde muelles o escollera, colecta con lancha o colecta con embarcación mayor, en la figura 5 se muestra la red que se utiliza comúnmente para colectar el plancton.

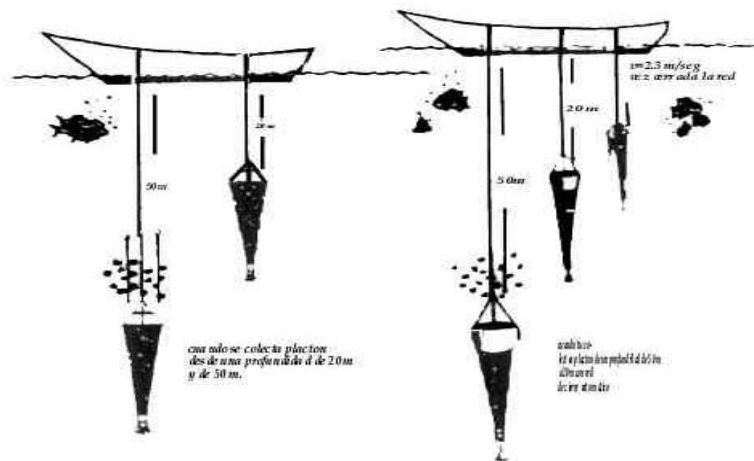


**Fig. 8** Red de plancton cualitativa

- 1) *Colecta sin el uso de embarcaciones en playas.* Se amarra la red de plancton a un extremo del cabo, toma fuertemente con la mano el otro extremo de la red y arroja la red a la superficie del agua lo más lejos posible, repitiendo esta operación 3 o 4 veces se logra obtener una buena cantidad de plancton en el colector de la red.



- 2) *Colecta desde muelles o escolleras.* Se amarra la red de plancton a un extremo del cabo de 10 m de longitud, a los 3 metros del cabo de la red se amarra un palo de aprox. 4 m de longitud y por el otro extremo del cabo, jalar la red a una velocidad de 1 m/seg.
- 3) *Colecta con lancha.* Se amarra firmemente el extremo del cabo de la red a alguna parte de la lancha, la cual puede ser impulsada a remo o con motor fuera de borda a una velocidad de 1m/seg. Tomar el cabo con la mano y mantener la red a 1 m por debajo de la superficie del agua y conservar una velocidad constante.
- 4) *Colecta con embarcación mayor.* Se efectúa el muestro horizontal, asimismo mediante el uso de un malacate efectuar el muestreo vertical colocando una plomada en el extremo inferior de la red y sumergir a la profundidad de 50 m. Primero sumergirla a 50 m elevarla a la superficie luego de una profundidad de 20 m a la superficie para comparar cualitativamente el plancton de las capas inferior y superior.



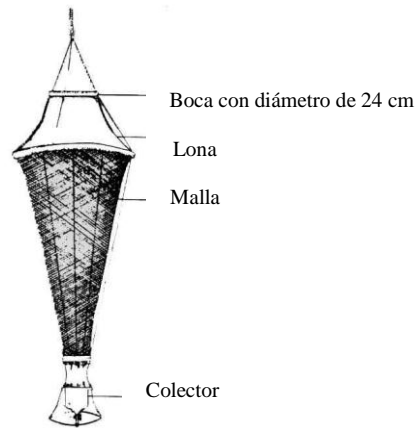
**Fig. 9** Colecta de fitoplancton con embarcación mayor

#### *Procedimiento de colecta cualitativo*

- 1) Situar el bote encima de la mancha de marea roja y apagar el motor.
- 2) Sumergir la red dentro del agua empezando por la parte mas delgada.
- 3) Después de arrastrar la red a una distancia determinada, sostener la boca de la red fuera de la superficie del agua, elevar y sumergir la parte de la malla de nylon dentro del agua para que el plancton adherido a las paredes de la red sea arrojado hacia la parte inferior del colector, enseguida abrir la llave del colector (quitar el colector), verterlo en un frasco,



Para este tipo de colecta se utiliza la red de plancton cuantitativo.



**Fig. 11** Red de plancton cuantitativa

En base a los resultados obtenidos del muestreo cuantitativo se compara con los límites máximos permisibles y es cuando se tienen los fundamentos para establecer si la cantidad de fitoplancton en agua de mar rebasa estos límites para proceder a tomar decisiones.<sup>(21)</sup>

La fase de contingencia inicia cuando al menos tres muestras rebasen los niveles de concentración que se enumeran a continuación.

**Tabla 6.** Limite máximo permisible del fitoplancton en agua de mar <sup>(18)</sup>

<b>Plancton</b>	<b>Limite Máximo Permisible</b>
Fitoplancton en agua de mar	5,000 cel / L

Se dicta como fase de precontingencia en el caso del fitoplancton al analizar tres muestras diferentes rebasen los niveles de concentración indicados en la siguiente tabla:

**Tabla 7.** Concentración de precontingencia de fitoplancton en agua de mar. <sup>(18)</sup>

<b>Plancton</b>	<b>Concentración</b>
Fitoplancton en agua de mar	2,500 cel / L

La frecuencia del monitoreo en ausencia de Marea Roja, en precontingencia y contingencia será al menos la indicada en la Tabla 8:

**Tabla 8.** Frecuencia de monitoreo en caso de FAN.

<b>Frecuencia</b>	<b>Cantidad</b>
1 muestreo cada 4 días, para la determinación de biotoxinas marinas en fitoplancton.	100 ml de agua

La utilidad del bioensayo en ratones es importante porque lo rápido e intenso de la respuesta esta en función del modo de acción de la toxina, además de que el resultado se obtiene en pocas horas. <sup>(22)</sup>

En 1937 Sommer y Meyer<sup>(23)</sup> idearon el primer sistema práctico de análisis, un bioensayo en ratón, que mide la toxicidad en términos de unidades ratón (UR), con el paso del tiempo se han desarrollado otros métodos para detección de la brevetoxina como se enuncia a continuación.

## **MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA BREVETOXINA**

### ***Ensayos in vivo***

El bioensayo señala la evaluación de la toxicidad por medio de una inyección intraperitoneal del extracto lipidico crudo de los moluscos bivalvos disuelto en aceite como vehículo de moluscos bivalvos en ratones. Este es un método oficial por el American Public Health Association (APHA), procedimiento hecho desde 1985 basado en la extracción de la toxina de los moluscos bivalvos con éter dietilico.

El inconveniente del ensayo en ratones es que este requiere un gran número de animales, se usa una relativa cantidad de moluscos para llevar a cabo la extracción y los resultados son interpretados subjetivamente y con escasa especificidad.<sup>(10)</sup>

## ***Ensayos in vitro***

### *Ensayo de células del neuroblastoma*

Esta técnica está basada en la respuesta de la toxina NSP en cuanto al voltaje en los canales de sodio. Esta alta interacción de especificidad que ocurre naturalmente con las formas de los receptores forma la base del ensayo neuroreceptor. La detección es basada en la velocidad de actividad funcional de reconocimiento del componente estructural, así mismo la afinidad de una toxina por este receptor es directamente proporcional al potencial de intoxicación. El límite de detección de PbTx es 0.25 ng/ 10 ml del extracto de tejido. PbTx puede ser detectada entre 4 a 6 horas pero el límite de detección puede cambiar con el tiempo de incubación hasta 22 horas. Este método ha sido modificado y simplificado con la incorporación de un procedimiento calorimétrico basado en la habilidad de la actividad metabólica de las células para reducir un componente tetrazolium nombrado MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2-yl ]-2,5-dipeniltetrazolium) a un producto formado de color azul. <sup>(10)</sup>

## ***Ensayos Bioquímicos***

### *Inmunoensayos*

Para la cuantificación de brevetoxina por inmunoensayos es la técnica de Elisa esta prueba se basa en la reacción antígeno anticuerpo, los micropozos de la placa son cubiertos con proteína ligada PbTx-3, posteriormente el conjugado enzimático, el estándar de toxina PbTx-3 y la muestra se adicionan a la placa, en donde el conjugado enzimático y la toxina PbTx-3 compiten por los anticuerpos.

Cualquier conjugado enzimático no unido es eliminado con lavados. La enzima sustrato (peroxidasa de rábano picante) y el cromógeno (OPD) son adicionados a la placa y se incuban.

El enlace de la enzima conjugado se convierte por acción del cromógeno de incoloro a azul, posteriormente se adiciona el reactivo de paro y hay cambio de azul a amarillo, el cual se lee a 492 nm, en donde los micropozos incoloros indican concentraciones altas de toxina y los micropozos con color muestran bajas concentraciones de toxina. <sup>(10)</sup>

## *Ensayos Químicos*

### *Detección MEKC*

MEKC, Micellar electrokinetic capillary chromatography, con Fluorescencia inducida por láser (L IF), esta detección ha sido usada para medir cuatro brevetoxina (PbTx-2, PbTx3, PbTx-5, PbTx-9) a niveles subatómicos. La brevetoxina fue aislada desde cultivos celulares y tejidos de peces; y el limite de detección en tejidos de peces fue de aproximadamente 4 pg/g.<sup>(10)</sup>

### *Electrospray LC/MS*

Este Método químico de detección Electrospray LC/MS (reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry fue aplicado con éxito para llevar a cabo la separación e identificación de la brevetoxina. Los limites de detección para PbTx-9, PbTx-2 y PbTx-1 fueron 600 fmol, 1 pmol y 50 fmol, respectivamente. Asimismo 6 componentes desconocidos en total fueron detectados, así como un posible isomero de PbTx-9.<sup>(10)</sup>

Cada uno de los métodos de análisis que son usados para determinar la brevetoxina tiene ciertamente sus ventajas pero también sufre de desventajas:

- El bioensayo en ratones, que es el mas comúnmente usado, pero tiene poca especificidad y usa una gran cantidad de animales.
- El método de Elisa solo es aplicable para PbTx-2 y no esta habilitado para ensayos con tejidos de peces y solo tiene una limitada sensibilidad para tejidos de moluscos bivalvos.
- El ensayo de células de neuroblastoma, aunque es sensitivo, sufre de interferencias.
- Un método que es válido por su sensibilidad y especificidad es LC/MS, detectando componentes individuales, pero este método requiere de equipo muy caro.

Uno de los principales obstáculos para que un método químico sea utilizado comúnmente para la determinación de la brevetoxina es que los equipos son muy caros y los materiales de referencia son extremadamente escasos.

La determinación más utilizada es el bioensayo en México por ser un método oficial (APHA). El Laboratorio Nacional de Salud Pública perteneciente a la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), está encargado de realizar los análisis de bioensayo en ratón para la biotoxina marina, brevetoxina y donde se utiliza como vector el aceite de algodón y que debido a su difícil disponibilidad se contempla la utilización del aceite de oliva.

## **DISPONIBILIDAD DEL ACEITE DE ALGODÓN Y DE OLIVO**

### *Aceite de Algodón*

En su estado silvestre, las plantas pueden crecer más de 3 m. Las hojas son anchas con 3 ó 5 lóbulos (a veces incluso siete). Las semillas están contenidas en una cápsula llamada baya y cada una rodeada por una vellosa fibra llamada hilacha.

El cultivo de algodón es uno de los que más productos químicos utilizan, de forma que puede contaminar las tierras de cultivo. El algodón también requiere gran cantidad de agua en comparación con otros cultivos.

En el desmonte del algodón, con el fin de reducir la incidencia del gusano rosado del algodón en los desperdicios, en ciertos países, se regula estrictamente el movimiento y eliminación de la semilla de algodón y la basura. Donde permitan los reglamentos, se envía la semilla a los molinos que extraen el aceite.

La semilla de algodón no se caracteriza por contener un alto porcentaje de aceite comparado con otras semillas oleaginosas.

En México se consume 2.4% y 1.5% de la harina y aceite, respectivamente, que se demanda en el mundo.

Las importaciones que México realizó fueron principalmente en sus presentaciones de semilla, aceite y fibra, adquiriéndolos casi en su totalidad de los Estados Unidos de Norteamérica.

En E. U. a finales de 1860, se inventó un método comercial viable para la extracción del aceite, y desde entonces el Aceite de Algodón se ha utilizado continuamente. En la actualidad, mas de un billón de libras de Aceite de Algodón se producen anualmente en los Estados Unidos. Se exporta una tercera o cuarta parte.<sup>(24)</sup>

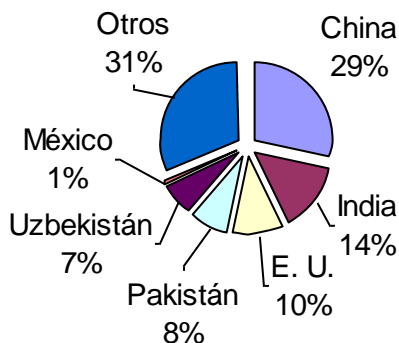
A nivel mundial la producción del aceite de algodón esta representado por China, Estados Unidos e India, ellos se caracterizan por la parte mayoritaria en cuanto al cultivo de algodón.

**Tabla 9.** Producción del aceite de Algodón en el mundo.

País	Producción (miles de ton.) 2007
China	1010
India	501
E. U.	352
Pakistán	290
Uzbekistán	235
México	46
Otros	1093
Mundial	3527

*Fuente: ACERCA con información del USDA*

### Producción del aceite de Algodón a nivel mundial





De acuerdo con un estudio realizado por la Asociación Nacional de Industriales y Mantecas Comestibles, el algodón ocupa el séptimo lugar como productora de aceite, detrás de semillas como son cártamo, ajonjolí y olivo.

### ***Aceite de Olivo***

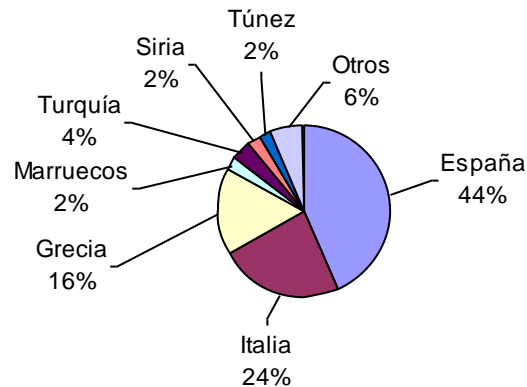
Existen dos hipótesis sobre el origen del olivo, una que postula que proviene de las costas de Siria, Líbano e Israel y otra que considera que lo considera originario de Asia menor.

El olivo tiene unas exigencias climáticas estrictas si queremos que crezca bien y que de buenos frutos. No crece en los lugares donde en los inviernos se alcanzan temperaturas menores a  $-9^{\circ}$  C, ya que morirían los árboles. Sin embargo los olivos necesitan una cierta cantidad de frío durante el invierno, con objeto de que se produzcan flores para la próxima cosecha. La composición en ácidos grasos varía mucho y depende del tipo de cultivo, las condiciones climáticas locales y de otros factores. En la siguiente tabla se observa la producción del aceite de olivo a nivel mundial.

**Tabla 10.** Producción del aceite de Olivo en el mundo

País	Producción (miles de ton.) 2007
España	1,750.0
Italia	950
Grecia	657.4
Marruecos	85
Turquía	160
Siria	100
Túnez	80
Otros	259.5
Mundial	4041.9

### Producción de Aceite de Olivo a nivel mundial



Fuente COI, 2007.

En México, la superficie cultivada con olivo ha tenido un incremento muy fuerte debido a la promoción que se hizo del cultivo.

A nivel mundial la producción del aceite de olivo es mayor que la producción del aceite de algodón como se representa en las graficas anteriores.

### Relación de costos del aceite de algodón y aceite de oliva

Los aceites utilizados en el desarrollo experimental son de grado analítico y

El aceite de oliva es de baja acidez, altamente refinado, se especifica que sea utilizado para uso de laboratorio y no para uso en el hogar u otros usos, este producto proviene de Sigma Diagnostics, Inc. St. Louis, USA.

Los costos de los aceites se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 11.** Cotización de aceites de algodón y de olivo

Presentación	Descripción	Marca	Clave de Catálogo	Precio unitario
Fco. de 500 ml	Aceite de Algodón	Sigma	C7767	\$770.00
Fco. de 100 ml	Aceite de Oliva	Sigma	O1514	\$1,095.00

Desde el punto de vista de costos de los aceites es mas rentable utilizar el aceite de algodón que el de olivo, sin embargo la finalidad de este trabajo es encontrar una sustituto de este aceite en caso de una contingencia, porque como ya se menciona la producción del aceite de olivo es mayor a nivel mundial que la del aceite de algodón que su semilla aporta una menor cantidad de aceite que el de la aceituna.

### Uso del aceite como adyuvante

Un gran numero de cuestiones han sido numeradas cuando se desarrolla un experimento, se recomienda a los aceites vegetales como convenientes cuando la sustancia a administrar es lípido soluble, sin embargo la absorción es un poco mas tardada en estos casos.

Para que los aceites puedan ser usados como suspensiones para administrar fármacos o en pruebas de toxicidad deben de cumplir con lo que se establece en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, estos parámetros se indican en la siguiente tabla 12.

**Tabla 12.** Propiedades fisicoquímicas de los aceites <sup>(25)</sup>

ANÁLISIS	ACEITE DE ALGODÓN	ACEITE DE OLIVO
Densidad Relativa (g/ml) (20°C)	0.9150 – 0.9210	0.9100 – 0.9150
Índice de yodo (%)	109 – 120	79 - 88
Índice de saponificación (mg KOH / g muestra)	190 – 198	190 - 195
Índice de peróxido (meq /Kg muestra)	<10	<10
Índice de acidez (% de ácido oleico)	≤0.2	≤0.2
Índice de refracción (20°C)	1,465-1,470	1,463-1,472
Metales pesados (%)	No más de 0.001%	No más de 0.001%

Al cumplir el aceite de oliva que se utiliza con estos parámetros y tener la disponibilidad en el mercado, se podrá utilizar como sustituto en la determinación de la brevetoxina.

## LA METODOLOGÍA CONSTA DE TRES PARTES:

- A) Caracterización fisicoquímica del aceite de olivo y del aceite de algodón.
- B) Ensayo biológico utilizando aceite de olivo y aceite de algodón.
- C) Planteamiento del protocolo de validación de la sustitución del aceite de algodón por el aceite de olivo.

La metodología se dividió en 3 partes, la primera parte trata de un estudio realizado a ambos aceites para conocer sus características fisicoquímicas, la segunda parte observar su comportamiento al ser utilizados en el bioensayo. Y la tercera parte evaluar esta comparación mediante el planteamiento de un protocolo de validación parcial.

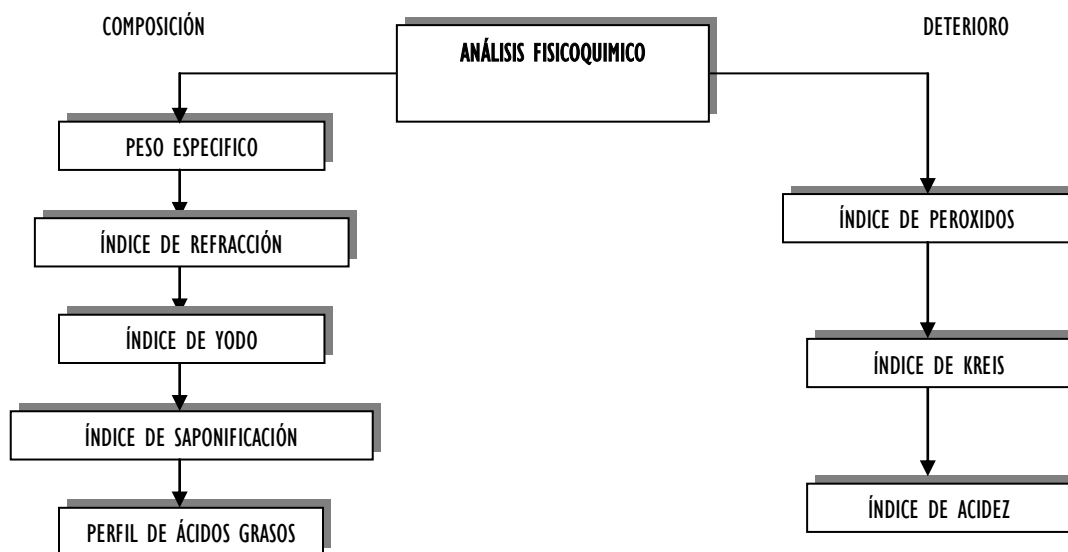
### A) CARACTERIZACIÓN FISICOQUIMICA

El análisis fisicoquímico realizado fue para conocer las diferencias y similitudes en las propiedades de cada aceite.

Datos de los aceites utilizados:

<b>Producto:</b> Aceite de Oliva	<b>Producto:</b> Aceite de Algodón
<b>Marca:</b> Sigma Diagnostics, Inc.	<b>Marca:</b> Sigma Chemical, CO.
<b>Lote:</b> 012K6042	<b>Lote:</b> 48H1006

Las pruebas realizadas fueron las siguientes (por triplicado):



## PRUEBAS DE COMPOSICIÓN

### PESO ESPECIFICO:

Esta prueba se basa en la relación que existe, entre el peso de un volumen de una sustancia y el peso del mismo volumen de agua, a una temperatura dada.

El picnómetro esta a temperatura constante del medio ambiente. Llenar el picnómetro hasta el borde superior con agua, introducir el termómetro, pesar y anotar la temperatura de la determinación. A continuación se vacía el picnómetro para que este de nuevo a temperatura ambiente (20° C) y seco para que se llene con el aceite hasta el borde superior, introducir el termómetro, pesar y anotar la temperatura de la determinación.

Se determina la masa de la unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico, referida a una temperatura que generalmente es de 20° C para los aceites. <sup>(26)</sup>

### ÍNDICE DE YODO:

La determinación de yodo es el mas común de los métodos de halogenación, y se basa en la adición de un exceso de halógeno a la muestra, reducción del exceso con KI y finalmente la titulación del yodo liberado con tiosulfato de sodio.

Se preparo un matraz, se peso el aceite en el frasco 0.18 g y se añadió 5 ml de tetracloruro de carbono disolviéndose la muestra.

Se le añadieron 10 ml de disolución de Wijs, (el reactivo de Wijs se preparo disolviendo 8 g de tricloruro de iodo en 200 ml de ácido glacial y se mezclo con una disolución de 9 g de iodo en 300 ml de tetracloruro de carbono, esta mezcla se diluyo a 1000 ml con ácido acético glacial), se agito, y se coloco el tapón. Se dejo en reposo en la oscuridad durante un tiempo de 30 minutos y a continuación se agrego 10 ml de disolución de KI al 10% y 50 ml de agua destilada, se agito y se valoro con una disolución de tiosulfato sódico 0.1 N, hasta que la solución adquirió un color amarillo muy pálido entonces se le agrego disolución de almidón y se continuo la valoración. Simultáneamente se preparo un blanco de reactivos. <sup>(27)</sup>

El valor de yodo de una sustancia es el peso de yodo absorbido por cien gramos de la sustancia. Se reporta en por ciento (%). <sup>(28)</sup>

## ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN:

El método se basa en la reacción química que se lleva a cabo bajo condiciones establecidas, entre los ácidos grasos totales contenidos en un producto dado y una solución alcohólica de hidróxido de potasio. Como productos de reacción se obtienen las derivadas de los ácidos correspondientes.

Se monto un equipo de reflujo, colocando en el matraz aproximadamente 2 g de aceite y se adiciono 25 ml de una solución alcohólica de KOH (0.5 M en etanol al 95 %). Se llevó a ebullición suave y se mantuvo así durante 1 hr.

La titulación se llevo a cabo adicionando 1 ml de solución de fenolftaleína (1%). Se titulo en caliente el exceso de álcali con ácido clorhídrico valorado (0.5N).

Se preparó un blanco de reactivos y se calculo el índice de saponificación como: mg. de KOH necesarios para saponificar los ácidos grasos totales de un gramo de muestra.<sup>(29)</sup>

El índice de saponificación es la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio requerido, para llevar a cabo la hidrólisis alcalina de los ácidos contenidos en un gramo de aceite.

## PERFIL DE ACIDOS GRASOS:

El método se basa en la separación y determinación por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Los registros del cromatograma obtenido se identifican con los correspondientes ácidos grasos de acuerdo con sus tiempos de retención. La identificación se realizo por comparación con los cromatogramas obtenidos con sustancias de referencia en las mismas condiciones.

El cromatógrafo utilizado fue un Hewlett Packard Mod. 5880 con detector de ionización de flama.

Condiciones de trabajo:

Columna:

Capilar SP <sup>TM</sup> -1000 marca Supelco	
Longitud	30 m
Diámetro interno	0.32 mm
Grosor fase líquida	0.25 $\mu$ m
Gas acarreador H <sub>2</sub>	$\mu$ = 54 cm/ seg; $\delta$ = 1.8 ml / min.

Temperaturas:

Detector	220 ° C
Inyector	220 ° C
Columna	220 ° C

Este análisis nos permitió hacer la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de los aceites de oliva y de algodón.

La composición porcentual de la mezcla de ácidos grasos se obtiene refiriendo la superficie de cada pico  $P_i$  a la superficie total, suma de la de todos ellos  $\sum i P_i$ :

$$[\%] = AG_i = \frac{P_i}{\sum i P_i}$$

Siendo  $AG_i$  fracción del componente  $i$  en la mezcla de ácidos grasos.

$P_i$  superficie del pico correspondiente <sup>(30)</sup>

### ÍNDICE DE REFRACCIÓN:

Mide el cambio de dirección que se produce cuando un rayo de luz pasa a través de la sustancia problema. Este índice ayuda a detectar la pureza del aceite y su identificación. <sup>(28)</sup>

Este es el grado de deflexión de un rayo de luz, cuando pasa a través de un medio transparente a otro. Para esta determinación se usó el refractómetro de Abbe, se controló la temperatura a 24 °C, es importante mencionar que el índice de refracción baja al aumentar la temperatura, aumenta con el largo de la cadena de carbonos y con el número de dobles ligaduras presentes en la cadena.

## PRUEBAS DE DETERIORO

Estas pruebas se realizaron, cuando los frascos fueron abiertos por primera vez, se procedió a realizar los exámenes de deterioro con el fin de que el oxígeno no reaccionara con los aceites e interfiriera con los resultados obtenidos. Debido a la presencia de instauraciones en estos aceites tienen una gran reactividad química ya que están propensos a dos tipos de deterioros: la rancidez hidrolítica que es la liberación de ácidos grasos de los ésteres, por hidrólisis; y el otro deterioro se debe a transformaciones oxidativas y de isomerización por lo que es muy importante que el envase donde se guardan los aceites se mantuviera a una temperatura adecuada (temperatura ambiente) y que el envase fuera de color ámbar para protegerlos de la luz que pudiera provocar la oxidación en el aceite.

### ÍNDICE DE PEROXIDOS:

Se pesó el aceite en un matraz erlenmeyer de 250 ml y se le adicionaron 25 ml de solución de ácido acético / diclorometano (3:2), a esta solución se le adiciono 0.5 ml de una solución saturada de yoduro de potasio y se dejó reposar durante 60 seg. en la oscuridad.

Se le agregó 75 ml de agua desionizada hervida y fría y se tituló lentamente con tiosulfato de sodio 0.1 N, hasta que se obtuvo un color amarillo pálido. Se le adiciono 0.5 ml de solución de almidón indicador y se continuó la titulación hasta que desapareció el color azul.<sup>(21)</sup>

El índice de peróxidos se obtiene calculando los miliequivalentes de tiosulfato utilizados en la titulación.<sup>(28)</sup>

Se disuelve la muestra en una mezcla de cloroformo y ácido acético glacial y se mezcla con una disolución de yoduro potásico. La cantidad de yodo liberada por reacción con los grupos peróxido se determina finalmente por valoración con una disolución de tiosulfato sódico.



### **ÍNDICE DE KREIS:**

El índice de Kreis aporta información sobre la cantidad de aldehídos producidos (malonaldehído). Reacción con floroglucinol desarrollo de color rojo.

Se agitaron 10 ml de aceite en un tubo de ensayo con 10 ml de floroglucina al 0.1 % en éter dietílico y 10 ml de HCl concentrado. La aparición de un color rosa indicaría un enranciamiento incipiente, algunos aceites frescos dan una ligera coloración violeta.<sup>(27)</sup>

### **ÍNDICE DE ACIDEZ:**

En un matraz erlenmeyer se colocó aproximadamente 0.5 g de aceite y se adicionó 25 ml de alcohol previamente neutralizado. Se calentó el matraz en un baño de agua en ebullición suave y se tituló en caliente con KOH 0.0025 N, agitando fuertemente después de cada adición de álcali.<sup>(29)</sup>

Se reporta como la cantidad de KOH necesaria para neutralizar la acidez libre de un gramo de muestra.<sup>(28)</sup>

## B) ENSAYO BIOLÓGICO UTILIZANDO ACEITE DE ALGODÓN Y ACEITE DE OLIVO

Es una técnica analítica que se utiliza para la detección de brevetoxina, mediante la aplicación de una prueba biológica en ratón.

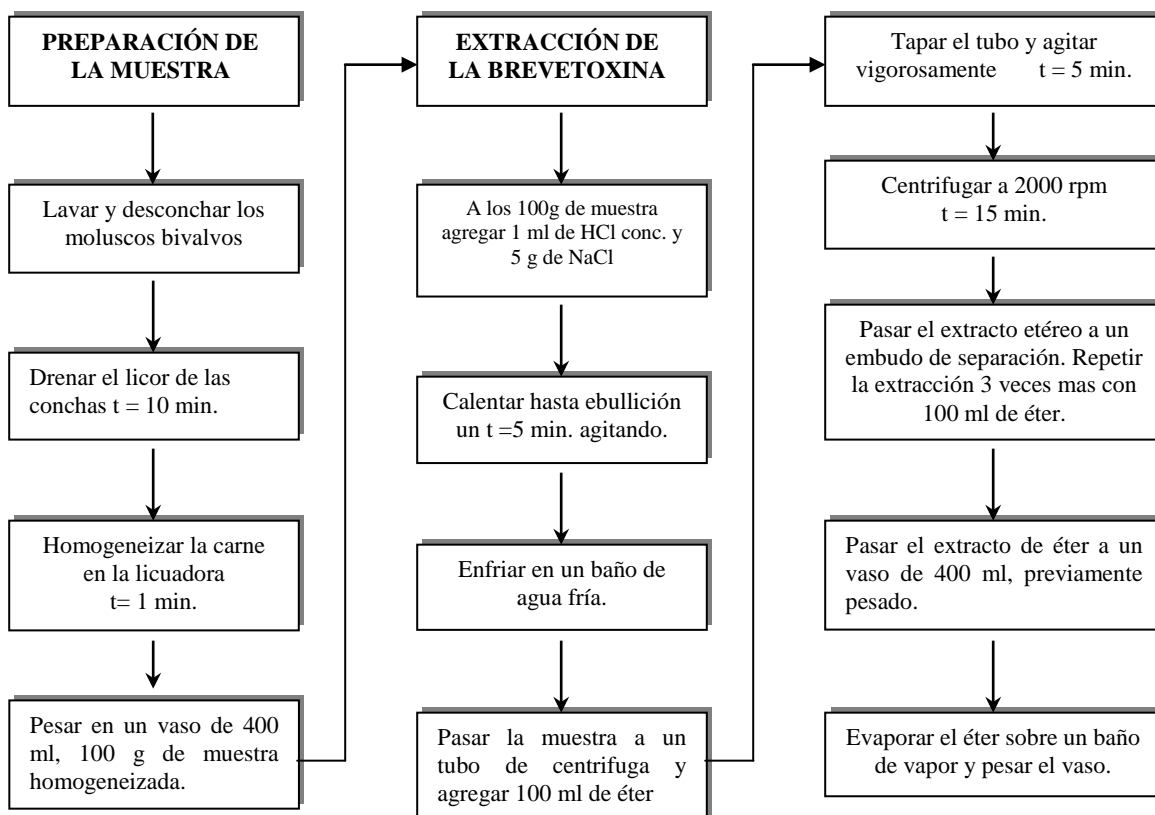
### Acondicionamiento de la muestra:

Las muestras que se utilizaron para el bioensayo fueron de moluscos bivalvos originarios del Golfo de México.

Las muestras recibidas se encontraban en hieleras que mantenían una temperatura de 4° C, posteriormente se realizó el lavado con agua y cepillo para eliminar el exceso de lodo y tierra de las conchas de los moluscos.

Se abrieron los moluscos utilizando una navaja especial para ello, los moluscos que presentaban la concha abierta se desecharon, y se procedió como indica el siguiente diagrama de flujo.

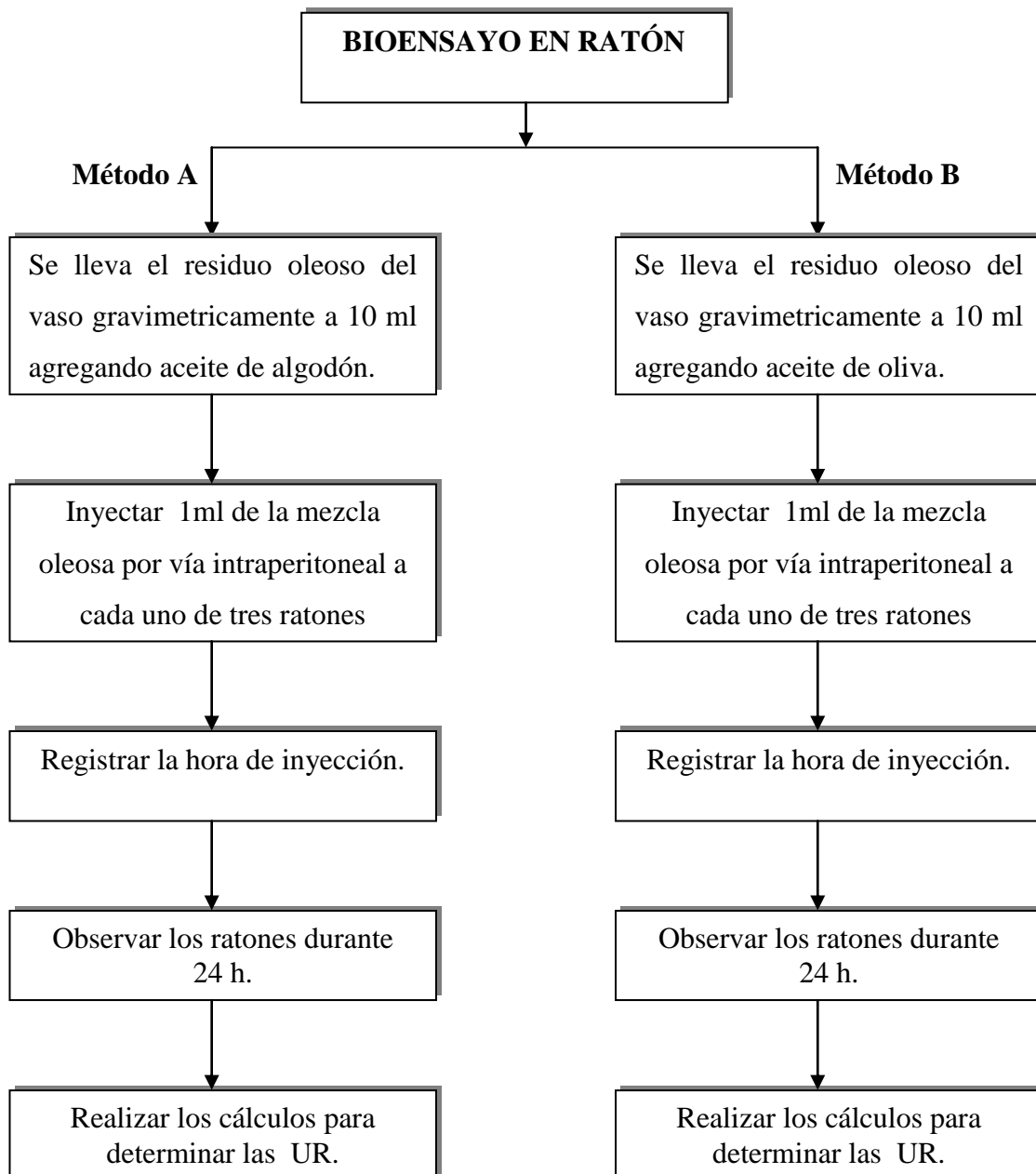
**Diagrama 2.** Acondicionamiento de la muestra de brevetoxina.



### Bioensayo en ratón:

A continuación se presenta el diagrama de flujo donde se describe el procedimiento realizado para el bioensayo en ratón utilizando como vehículos el aceite de algodón (método A, comúnmente utilizado) y el aceite de oliva (método B, aceite de prueba).

**Diagrama 3.** Realización del bioensayo en ratón.



Una vez pesado con exactitud el residuo oleoso, y considerando que la densidad de este residuo es la misma que la del aceite de algodón (1 ml ~ 0.9169 g), o que la del aceite de oliva (1 ml ~ 0.9135g) se llevo el residuo gravimétricamente a 9.17 g (10 ml), se mezcló muy bien el aceite y el extracto oleoso. Se lleno una jeringa de 3 ml para inyectar 1 ml de la mezcla por vía intraperitoneal a cada uno de 3 ratones de 19-21 g aproximadamente.

Se registro la hora de la inyección. Y se observaron a los ratones durante un tiempo no mayor a 360 minutos debido a razones de tiempo, y necesidad de obtener resultados lo mas pronto posible, en este tiempo se registra; si así es el caso la muerte de los ratones o se registra el tiempo de sobrevivencia de los ratones.

### **Cálculo de Toxicidad:**

Se determino el número de UR por ml, correspondiente al tiempo de muerte por cada 3 ratones inyectados. Se asigno como indeterminado: menos de (<) a las UR correspondientes a tiempos de muerte no determinados.

Se ajusto la UR para cada ratón de acuerdo con su peso (tabla 17, Anexo B).

En todo caso: determinar la media de UR/ml si se observa el 100% de mortalidad y los tiempos de muerte son determinados. Determinar la mediana de UR/ml si se observa el 100% de mortalidad y los tiempos de muerte son indeterminados (tabla 18, Anexo B).

Determinar la media de UR/ml si se observa menos del 100% de mortalidad.

Se calculo el total de UR por 100 g de carne de MBV, de la siguiente forma: UR por 100 g de carne de MBV = (UR/ml) x (factor de dilución (cuando sea aplicable)) x 10.

Cuando se determina la Toxicidad Relativa, se reporta como UR/100 g de carne de MBV.

La toxicidad relativa se define como cantidad de un químico que se estima que sea fatal al menos al 50% del organismo de prueba y el toxico en estudio no esta purificado.

Se ocupa la carne del MBV para hacer la determinación por que la brevetoxina como se menciona es liposoluble por lo tanto se encontrara en la parte grasa del MBV y no en el caldo que esta compuesto principalmente de agua.

Se reporta en UR por que es una forma de conocer la concentración de la toxina que se encuentra en el molusco junto con otros componentes y que no esta pura, mas no la cantidad del químico ( $\mu\text{g/ml}$ ) como seria si se tuviera un estándar para su determinación.

Cuando la toxicidad relativa es indeterminada reportar como:

- a) Número de ratones muertos en 24 h; toxina detectable: <10 UR/100 g de carne de MBV o
- b) Ningún ratón muere en 24 h; la toxina no es detectable <10 UR/100 g de carne de MBV. <sup>(31)</sup>

### Ejemplo del cálculo de UR

Cuando los ratones mueren a cierto tiempo (minutos) de ser inoculados les corresponde un valor de UR, (ver tabla 18, anexo B).

	UR / ml
20 minutos	4.5
18 minutos	5.0
16 minutos	6.0

Se ajusta UR de acuerdo con el peso de cada uno de los ratones, ya que a cada peso le corresponde un valor de factor de corrección, (ver tabla 17, Anexo B).

	UR / ML	PESO DE RATÓN (g)	FACTOR DE CORRECCIÓN
16 minutos	6.0	20.5	1.015
18 minutos	5.0	19.5	0.983
20 minutos	4.5	20	1.000

Se multiplica el UR/ml por el factor de corrección.

$$6.0 \times 1.015 = 6.09$$

$$5.0 \times 0.983 = 4.915 \quad \text{se obtiene la media de estos valores} = 5.1683$$

$$4.5 \times 1.000 = 4.5$$

Ahora se calcula el total de UR por 100 g de carne de molusco bivalvo (MBV).

Se multiplica la media de UR por ml inyectado X 10 (el volumen del residuo original que se llevo a 10 ml con el aceite).

$$5.1683 \times 10 = 51.683 \text{ UR por } 100 \text{ g de carne de MBV} = 51.683 \text{ UR} / 100 \text{ g de carne de MBV.}$$

### Toxina determinada

Cuando los ratones viven el tiempo (en minutos) de observación se registra como mayor a los 930 minutos y son sacrificados. Ver en la tabla 18 el valor de UR / ml que corresponde a este tiempo

	UR / ml
Mayor a 930 minutos	1.0
Mayor a 930 minutos	1.0
Mayor a 930 minutos	1.0

Se ajusta UR de acuerdo con el peso de cada uno de los ratones, ya que ha cada peso le corresponde un valor de factor de corrección, (ver tabla 17, anexo B).

	UR / ml	Peso de ratón (g)	Factor de corrección
Mayor a 930 minutos	1.0	19.5	0.983
Mayor a 930 minutos	1.0	20	1.000
Mayor a 930 minutos	1.0	20.5	1.015

Se multiplica el UR/ml por el factor de corrección:

$$1.0 \times 0.983 = 0.983$$

$$1.0 \times 1.000 = 1.000 \quad \text{se obtiene la media de estos valores} \quad 0.9993$$

$$1.0 \times 1.015 = 1.015$$

Ahora se calcula el total de UR por 100 g de carne de molusco bivalvo (MBV).

Se multiplica la media de UR por ml inyectado x 10 (el volumen del residuo original que se llevo a 10 ml con el aceite).

$$0.9993 \times 10 = 9.993 \text{ UR por 100 g de carne de MBV} = \text{Menor a 10 UR / 100g de carne de MBV.}$$

Los niveles máximos permisibles para la brevetoxina para las especies de moluscos bivalvos (ostión, almeja, mejillón y escalopas) en sus diferentes variedades, así como de otros moluscos, debe ser como se indico en la tabla 4.

La fase de precontingencia inicia cuando al menos una muestra rebase el nivel de concentración de 10 UR/100g de carne de molusco y la contingencia cuando es igual o superior a 20 UR/100 g de carne. <sup>(18)</sup>

Para realizar la estandarización de este método biológico con los 2 diferentes aceites se utilizaron ratones de cepas NIH genotípicamente controlados.

El número de muestras de extracto graso de moluscos se rotuló con número y letra por lo que se dividió en dos partes para hacer 60 determinaciones con aceite de oliva y 60 determinaciones con aceite de algodón, en estas determinaciones una de las variaciones importantes fue la muestra de moluscos porque cada par de muestras que fueron disueltas con aceite de oliva y aceite de algodón fueron diferentes al siguiente par de muestras y así sucesivamente hasta que se realizaron las 60 determinaciones, estas determinaciones sirvieron a su vez de monitoreo para determinar si en el periodo experimental se presentó o no la marea roja en el Golfo de México.

## C) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARCIAL

### DETERMINACIÓN DE LA BREVETOXINA MARINA SUSTITUYENDO EL ACEITE DE ALGODÓN POR EL ACEITE DE OLIVA EN EL BIOENSAYO

#### 1. OBJETIVO:

Evaluar los parámetros de desempeño recomendados para la validación parcial en la determinación de la brevetoxina marina realizando el cambio de un reactivo por otro, la sustitución del aceite de algodón por el aceite de oliva en el bioensayo.

#### 2. ALCANCE

Aplica a las muestras provenientes de moluscos bivalvos contaminados por el dinoflagelado *Karenia Brevis*.

#### 3. DEFINICIONES

*Validación de métodos:* Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación prevista. NMX-CH-152-IMNC-2005.

*Objetivo de la validación de métodos:* Los estudios de Validación demuestran que un método se puede utilizar para un analito específico en una matriz determinada, usando la instrumentación específica, un tratamiento de muestra específico, en un laboratorio adecuadamente equipado y con personal calificado.

*Métodos o procedimientos normalizados:* aquellos publicados en Normas Oficiales Mexicanas, Normas Mexicanas o los emitidos por organizaciones de normalización, extranjeras, regionales internacionales, todas reconocidas, tales como ISO, EN, ASTM, AOAC, EPA, USP, Standard Methods, etc.



*Blanco:* es el alimento a ser usado como matriz, en el cual no fue detectado el analito cuando fue analizado por el método de referencia usado en el laboratorio, en diversas replicas.

*Límite de detección de Método Cualitativo:* Es la menor concentración de un analito en una muestra que puede ser detectada, mas no necesariamente cuantificada, en las condiciones definidas para el método, con un nivel de confianza especificado. Es siempre superior al nivel crítico.

*Limite de Cuantificación:* Es la menor cantidad del analito que puede ser medido y cuantificado con precisión y exactitud aceptables, en condiciones experimentales definidas para el método en validación.

*Linealidad:* Es la habilidad de un método de, cuando usado con una determinada matriz, ofrecer resultados que correspondan a una proporción de la cantidad del analito presente en la muestra. Un incremento del analito en la muestra corresponderá a un incremento lineal o proporcional en el resultado.

*Analito:* Componente específico de una muestra, puede ser un microorganismo o un grupo microbiano (taxonómico o no) definido a evaluar en un análisis.

*Blanco:* Es el alimento a ser usado como matriz, en el cual no fue detectado el analito cuando fue analizado por el método de referencia utilizado en el laboratorio, en diversas replicas.

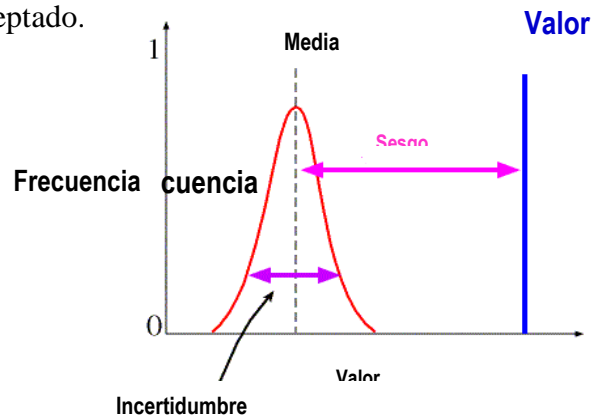
*Parámetros de desempeño:* recomendados para la validación parcial: Intervalo lineal y de trabajo, límites de detección y cuantificación, Recuperación y sesgo.

*Limite de detección:* Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

“Outlier” ó resultados aberrantes: Corresponde a cualquier valor extremo que ocurra debido a situaciones anormales. En menos de 1% de las pruebas, esos resultados pueden ocurrir aleatoriamente en situaciones normales.

Sesgo: Es la suma de todos los errores sistemáticos inherentes al método, cualquiera que sea el laboratorio que lo usa.

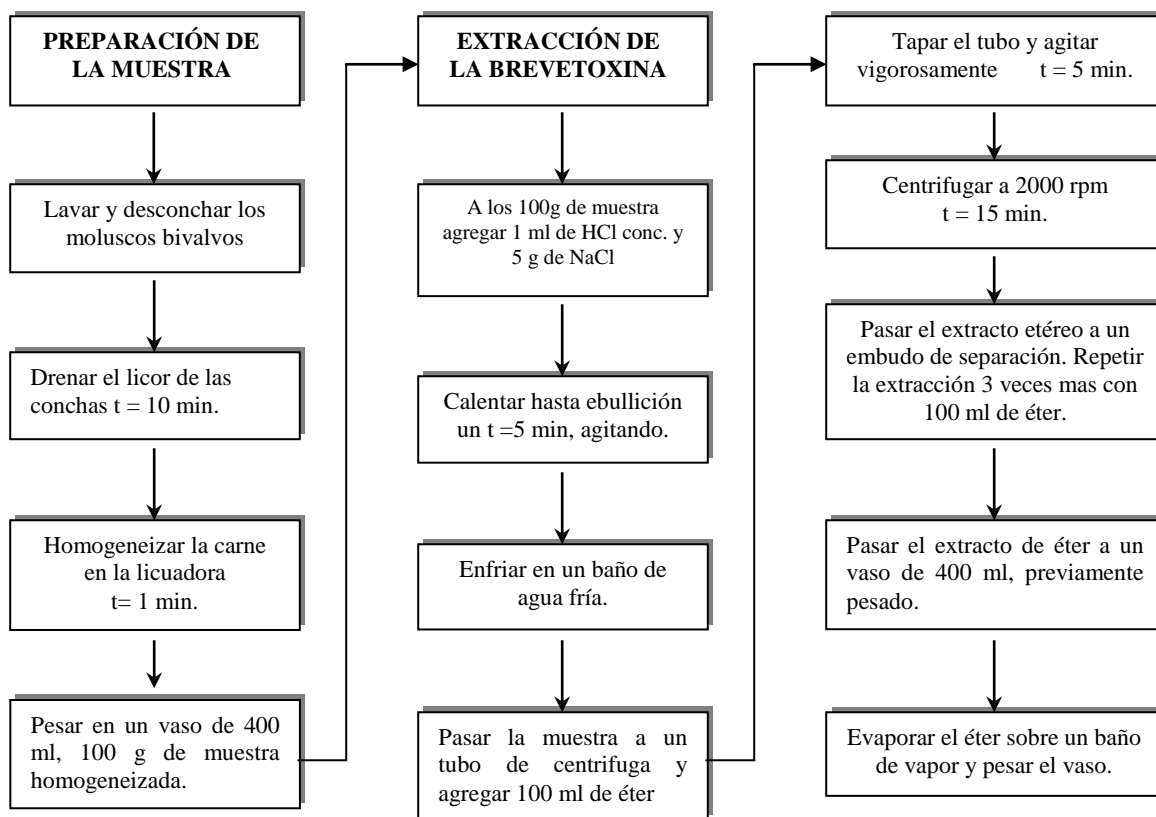
Se expresa como la diferencia entre el valor de la media aritmética de la recuperación y el valor verdadero aceptado.



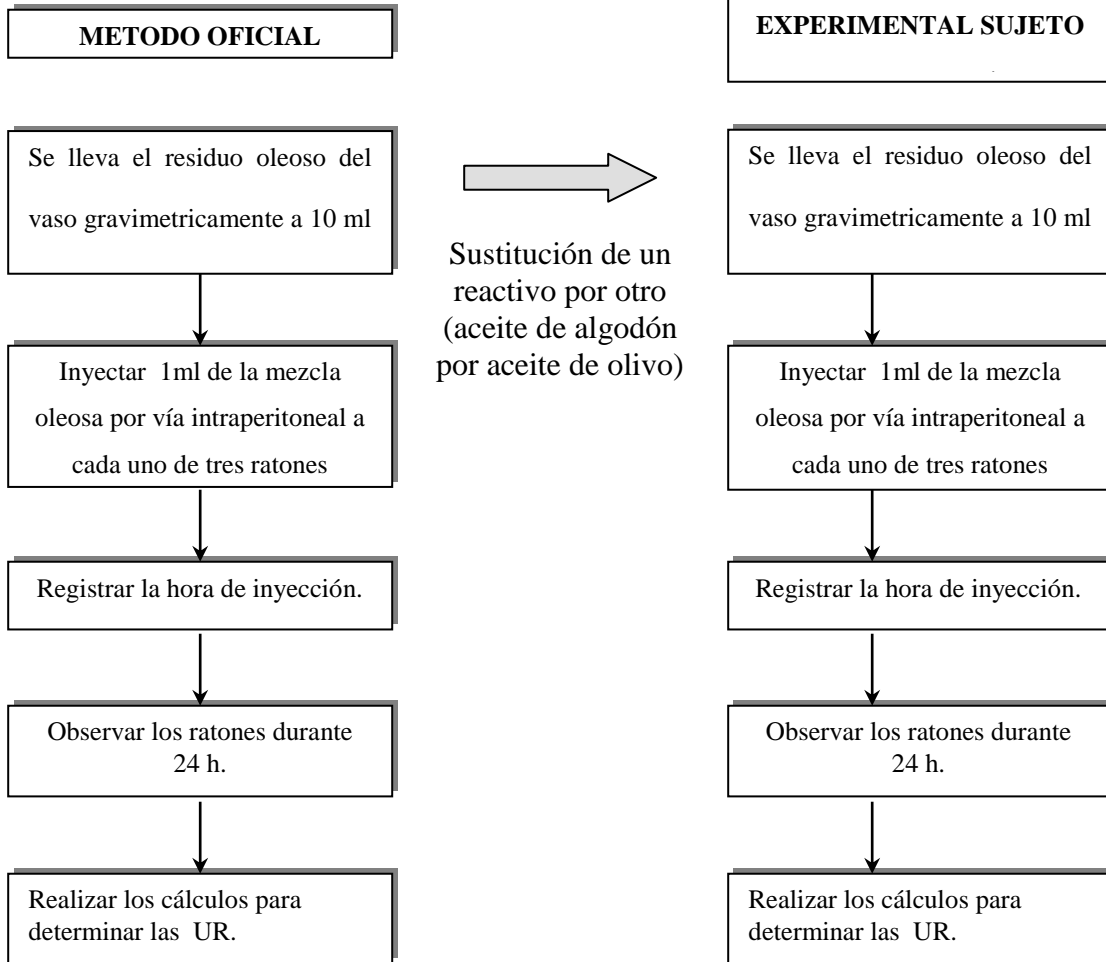
Prueba ó evaluación de desempeño: Es la validación que realiza un laboratorio para demostrar que el método de ensayo ha sido establecido de acuerdo al método normalizado. Se conoce también como validación parcial siempre y cuando el método sea normalizado.

#### 4. MÉTODO DE ENSAYO

##### a) Acondicionamiento de la muestra de moluscos bivalvos para el bioensayo.



**b) Bioensayo en ratón**



## 5) ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA DE LA BREVETOXINA

### 5.1 Equipo

Equipo	Marca	Modelo	No. serie	No. inventario	Intervalo de trabajo
Licuada	Osterizer	OX-954	A147	SOO-09-I0600000421	8 velocidades
Cronometro	Citizen	TPM	DX535	SOO-09-I0600000125	Medición hasta 72 h
Parrilla eléctrica	Thermolyne	HP115147	J8925	SOO-09-I0600000342	50-350°C
Campana de extracción	Air Extractor	A-30120	B547	SOO-09-I0600000098	Motor de 1HP con ducto extractor 6"
Centrifuga				SOO-09-I420200042-0003	0 a 5000 rpm
Balanza granataria	Sartorius	M-718	L52578	SOO-10-I080000000-00097	Hasta 20 g
Balanza analítica	Sartorius	S-413	K23476	SOO-09-I060000000-00071	Hasta 250 g
Baño de vapor	Thermolyne	JP512	M5412	SOO-09-I060000000-00254	Hasta 100°C

### 5.2 Materiales

#### 5.2.1 Material de uso general

Espátula  
 Colador  
 Recipiente  
 Embudo de separación  
 Jeringas de 3 ml con agujas del num. 23 G.  
 Magnetos  
 Jaula con bebederos para ratones  
 Guantes de látex  
 Ratones sanos de cepa NIH, con peso de 19 a 21 g.

La variación del peso de los ratones no debe ser mayor de 0.5 g entre los grupos experimentales. No reutilizar los ratones de prueba.

#### 5.2.2 Material volumétrico

Descripción	Marca	Clave	Volumen nominal	Volumen real
Vaso de Precipitado	Pyrex	VP-05	500.0 mL	499±0.213
Tubo de centrifuga con tapón de rosca de 250 ml	Pyrex	TC-10	250.0 mL	249±0.462
Probeta de 100 ml	Pyrex	FQ-38	100.0 mL	100.04 ± 0.165
Vaso de pp.	Pyrex	VP-01	50.0 mL	49.05±0.312

### 5.2.3 Reactivos

Nombre	Marca	Grado	Pureza	Presentación	Lote
HCl	Merck	Para análisis	98.0%	250 ml	OC412944
NaCl	Merck	Para análisis	98.5 %	250 g	K2789556
Éter dietílico	Sigma	Para análisis	--	1000 mL	LY4556
Aceite de Algodón	Sigma	Para análisis	Refinado	500 mL	48H1006
Aceite de Oliva	Sigma	Para análisis	Altamente refinado	100 mL	012K6042

### 5.2.4 Patrones de referencia

Nombre	Marca	Concentración	Presentación	Lote
Solución estándar de brevetoxina (PbTx-2)	Sea Food Laboratory, FDA.	100 µg/mL	Vial de 1 ml	22404

### 5.3 Muestras

- Muestras de moluscos bivalvos procedentes del Golfo de México que no contengan la brevetoxina (de estas muestras unas servirán como muestra blanco y otras se adicionara la solución de referencia de la brevetoxina PbTx, siguiendo el protocolo de validación).

6) **REQUISITOS DE BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO PARA EL BIOENSAYO DE BREVETOXINA.**

<b>REQUISITOS</b>	<b>BPL*</b>
<b>PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización del laboratorio (Manual de Organización)</li> <li>• Programa de Capacitación</li> <li>• Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's)</li> </ul>	Personal y organización del laboratorio
<b>PROGRAMA DE MANTENIMIENTO PREVENTIVO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cronograma de Calibración y / o verificación de equipo</li> <li>• Responsabilidades</li> </ul>	Equipo
<b>PROCEDIMIENTOS DE EVALUACIÓN</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interna</li> <li>• Externa</li> </ul>	Auditorias
<b>SEGURIDAD</b>	Seguridad
<b>AREA DE TRABAJO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adecuada para la carga de trabajo</li> <li>• Orden y limpieza</li> <li>• Iluminación</li> <li>• Control de temperatura ambiental</li> <li>• Superficies</li> <li>• Instalaciones adecuadas para albergar animales de laboratorio.</li> </ul>	Instalaciones
<b>EQUIPO DE LABORATORIO</b> Balanza: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Granataria sensibilidad 0.1 g y capacidad 150 g</li> </ul> Termómetros: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad 0 – 150 °C precisión de 1 °C.</li> <li>• Calibrado y verificado</li> </ul>	Equipo y aparatos

\* <sup>(32)</sup> Norma ISO 17025

REQUISITOS	BPL*
<b>AGUA</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El agua empleada para el análisis es destilada o deionizada (resistividad &gt; 0.5 megaohm/cm a 25 °C o una conductividad &lt; 1 µsiemens/cm a 25 °C).</li> <li>• Cloro residual no detectable (0.1 ppm).</li> <li>• Análisis de metales disueltos específicamente Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn de estar libre de trazas &lt; 0.05 mg/l o un contenido total de metales pesados &lt; 0.1 mg/l.</li> <li>• La calidad microbiológica es de &lt; 500 UFC/ml.</li> </ul>	Materiales y reactivos
<b>MATERIAL DE VIDRIO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimiento de lavado.</li> <li>• Prueba de residuos de detergentes con solución acuosa de azul de bromotimol 0.04 %.</li> </ul>	
<b>MUESTRA</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de contenedores limpios impermeables y resistentes a la punción.</li> <li>• Identificación de la muestra (nombre del verificador, área de cosecha, fecha y hora de la colecta, entre otros).</li> <li>• Transporte entre 0 – 10 °C.</li> <li>• Tiempo de análisis (dentro de las siguientes 24 horas después de su recolección o preparación para su análisis).</li> </ul>	Muestra
<b>PROCEDIMIENTO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación de la muestra.</li> <li>• Inoculación de los animales.</li> <li>• Observación y registro del tiempo de muerte.</li> <li>• Determinación del factor de corrección (FC).</li> <li>• Cálculos.</li> </ul>	Método
<b>INFORME DE RESULTADOS</b>	Registros e informes
<b>USO DE COMPUTADORA</b>	Uso de computadora y requisitos de validación

\* <sup>(32)</sup> Norma ISO 17025



## **7) ESTANDARIZACIÓN DEL BIOENSAYO**

### **Preparación de la solución de referencia:**

**a)** Solución estándar de brevetoxina, PbTx-2, (100 µg/ml)

**b)** Solución de referencia de brevetoxina, PbTx-2, (1 µg/ml)

Preparar la solución de referencia de brevetoxina ( 1 µg de PbTx-2/ml) tomando 1,0 ml de solución estándar en matraz volumétrico de 100 ml, llevar al volumen con agua destilada acidificada con HCl (pH=3). Esta solución es estable por varias semanas si se guarda a 3 o 4 °C y el pH está entre 2,0 y 4,0.

### **Estandarización del bioensayo**

Diluir alícuotas de 10 ml de la solución de referencia con 10, 15, 20, 25 y 30 ml de agua, respectivamente. Posteriormente inyectar 1 ml de cada dilución por vía intraperitoneal a unos cuantos ratones de prueba. La mediana del tiempo de muerte debe estar entre 5 y 7 minutos, el pH de las diluciones debe estar entre 2 y 4, en ningún caso debe ser mayor a 4,5.

Probar diluciones adicionales con incrementos de 1 ml de agua destilada. Por ejemplo, si la alícuota de 10 ml diluidos con 25 ml de agua mata a los ratones en 5 a 7 minutos, preparar soluciones 10 + 24 y 10 + 26.

Inyectar a un grupo de 10 ratones con 2 diluciones (de preferencia 3) que estén dentro del tiempo entre 25 a 30 minutos. Aplicando dosis de 1 ml por vía intraperitoneal a cada ratón. Registrar el tiempo de inyección y de muerte lo más aproximado posible a intervalos de 5 segundos, si se registran 7 segundos, redondear a 5 segundos y si se registran 8 segundos redondear a 10 segundos. El tiempo de muerte es el tiempo transcurrido entre el término de la inyección y el último jadeo del ratón.

Pesar y anotar el peso de los 10 ratones, aproximando hasta 0,5 gramos e inyectar cada uno con un ml de 2 o 3 diluciones de preferencia que provoquen la muerte en una mediana de tiempo de 25 a 30 minutos.

Anotar los tiempos de muerte. Si más ratones de un grupo de 10 sobrevive a la inyección de una dilución particular de la solución de referencia, repetir la inyección en un nuevo grupo de 10 ratones. Antes de proceder a realizar la prueba. Con el segundo grupo, investigar las variables de procedimiento que pudieron haber provocado los resultados iniciales tales como filtración, derrame de la mezcla inyectada en el ratón o el no haber inyectado el volumen completo de la solución estándar.

## **Cálculos**

Determinar la mediana del tiempo de muerte para cada grupo de 10 ratones usados con cada dilución.

Descartar los resultados para cada grupo de 10 ratones que den una mediana de muerte menor de 25 o mayor de 30 minutos, si cualquier grupo de 10 ratones da una mediana de tiempo de muerte en el intervalo de tiempo mencionado, incluir todos los grupos de 10 ratones usados para que los cálculos de la dilución subsecuente o algunas muertes caigan en el rango deseado.

Usar los tiempos de muerte por cada ratón para cada grupo, en el cual la mediana de tiempo de muerte quede entre 25 y 30 minutos, determinar las Unidades Ratón correspondientes a partir de la tabla de Sommer's. Con el peso de cada ratón se determinará el factor de corrección en la tabla de correcciones de pesos de ratones. Multiplicar las Unidades Ratón por el factor de conversión del peso para determinar los valores para las Unidades Ratón corregidas por ml de diluciones seleccionadas, dividir los  $\mu\text{g}$  de toxina /ml calculados en las diluciones seleccionadas por las URC asociadas, para obtener el factor de conversión (FC). Calcular el promedio de FC individuales, el valor resultante es útil para verificar los ensayos de rutina, este valor representa los microgramos de veneno equivalentes a una UR.

Los valores individuales del FC obtenidos en el laboratorio, pueden variar significativamente si no existe un control absoluto de la técnica. Por lo regular el uso de estándares de referencia o estándares secundarios, depende del volumen de ejecución del trabajo de ensayo.

## **Uso de estándares en el ensayo de rutina de moluscos bivalvos**

Verificar los valores del FC periódicamente como sigue: Si los moluscos son analizados menos de una vez a la semana, determinar el valor del FC cada día que el ensayo sea ejecutado, inocular 5 ratones con una dilución apropiada de la solución estándar. Si los ensayos se realizan durante varios días a la semana, verificar solamente una vez por semana la dilución cuya mediana de tiempo de muerte cae entre 25-30 minutos. El FC así determinado deberá quedar dentro de  $\pm 20\%$  del FC estándar predeterminado.

Si los resultados no concuerdan, verificar el FC sobre una base de 10 ratones formado por la adición de 5 ratones inoculados con la misma dilución de solución estándar de

brevetoxina e incluir los resultados a los 5 ratones originales. Inocular un segundo grupo de 10 ratones. El promedio de valores del FC obtenidos de los 6 grupos de 10 ratones representan un nuevo valor de FC.

Repetir la verificación de los valores de FC de manera que los resultados sean consistentes dentro del  $\pm 20\%$ . Si se encuentran grandes variaciones, investigar la posibilidad de controlar y reconocer otras variables que afectan al método antes de proceder con los análisis de rutina.

### **Preparación de la muestra**

**a)** Almejas, ostiones y mejillones.- Lavar los moluscos bivalvos con agua potable retirando la arena y cualquier material extraño. Desconchar la carne con cuidado, sin lesionar el cuerpo del molusco.

Colectar aproximadamente 150 gramos de carne sobre un tamiz del número 10 y dejar escurrir durante 5 minutos. Descartar las conchas, moler la carne en una mezcladora o licuadora hasta la homogenización.

**b)** Escalopas.- Separar la porción comestible (músculo aductor) y solamente aplicar la prueba para esta porción sola. Drenar y moler como en (a).

### **Extracción de NSP**

Pesar 100 gramos de carne homogeneizada en un vaso de precipitado tarado.

Agregar 1 ml de solución de ácido clorhídrico (HCl) concentrado y 5 g de NaCl.

Calentar la mezcla hasta ebullición un  $t=5$  minutos agitando.

Enfriar en un baño de agua fría.

Pasar la muestra a un tubo de centrifuga y agregar 100 ml de éter.

Tapar el tubo y agitar vigorosamente un  $t= 5$  min.

Centrifugar a 2000 rpm un  $t= 15$  min.

Pasar el extracto etéreo a un embudo de separación. Repetir la extracción 3 veces mas con 100 ml de éter.

Pasar el extracto de éter a un vaso de 400 ml, previamente pesado.

Evaporar el éter sobre un baño de vapor y pesar el vaso.

Se lleva el residuo oleoso del vaso gravimetricamente a 10 ml agregando el aceite de prueba (aceite de algodón o aceite de olivo).

### **Prueba de bioensayo en ratón**

Pesar 3 ratones, anotando el peso para cada muestra que va a ser analizada. Inyectar por vía intraperitoneal cada ratón con 1 ml de la mezcla oleosa (3 ratones para la muestra disuelta en aceite de olivo y 3 ratones para la que se disolvió en aceite de algodón).

Descartar cualquier ratón en donde se pierda o se filtre más de una gota de extracto. Activar el cronómetro en el momento de la inyección y mantener la observación cuidadosamente hasta el tiempo de muerte, que se manifiesta por el último jadeo del animal. Registrar el momento de la muerte de cada ratón, el tiempo de muerte debe estar entre 25 y 30 minutos. Si la mediana del tiempo de muerte con el extracto no diluido es mayor de 30 minutos, el dato puede ser utilizado para determinar la toxicidad de la muestra.

### **Cálculo de la concentración de NSP**

( $\mu\text{g}$  de PbTx-2 / 100g de carne de molusco)

Determinar la UR/ml de extracto que corresponde a los tiempos de muerte observados de la tabla de corrección de pesos de ratones.

Calcular las URC, multiplicando las UR correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón por el factor de corrección del peso obtenido en la tabla de corrección de pesos de ratones.

Usar la mediana de los URC/ml de los tres bioensayos para determinar  $\mu\text{g}$  de veneno/100g de carne de molusco, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g PbTx-2} / 100\text{g carne de molusco} = \text{Mediana URC/ml} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200.$$

En donde:

FC = Factor de conversión

FD = Factor de dilución

Cualquier valor más grande que 80  $\mu\text{g}$  de toxina de brevetoxina/100g,<sup>(33)</sup> es considerado valor de riesgo y el molusco debe ser prohibido para consumo humano.

## 8) DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

### 8.1 Intervalo lineal y de trabajo

**8.1.a** Se prepararan por triplicado muestras de moluscos bivalvos con 0, 15, 20, 80, 120, 150 de  $\mu\text{g}$  de PbTx-2. Cada muestra se diluye con aceite de algodón y se inoculan a 3 ratones respectivamente. Se determina el tiempo de muerte de los ratones.

**8.1.b** Se prepararan por triplicado muestras de moluscos bivalvos con 0, 15, 20, 80, 120, 150 de  $\mu\text{g}$  de PbTx-2. Cada muestra se diluye con aceite de olivo y se inoculan a 3 ratones respectivamente. Se determina el tiempo de muerte de los ratones.

Se utiliza el Factor de corrección que se realizo con anterioridad para poder hacer los cálculos y determinar los  $\mu\text{g}$  de PbTx / 100 g de MBV.

#### Intervalo lineal.

Analista: A

Laboratorio: Microbiología

Analito: **neurotoxina PbTx-2**

Matriz: Carne de moluscos bivalvos

Unidades:  $\mu\text{g}$

#### 8.1.a Aceite de Algodón

$\mu\text{g}$ de PbTx-2	Resultados								
	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3		
Dosis	UR <sub>C</sub>	MUR <sub>C</sub> / ml	$\mu\text{g}$ PbTx-2 /100g carne de mbv	UR <sub>C</sub>	MUR <sub>C</sub> / ml	$\mu\text{g}$ PbTx-2 /100g carne de mbv	UR <sub>C</sub>	MUR <sub>C</sub> / ml	$\mu\text{g}$ PbTx-2 /100g carne de mbv
0									
10									
15									
20									
80									
120									
150									
		m=			m=			m=	
		b=			b=			b=	
		r=			r=			r=	

### 8.1.b Aceite de Olivo

µg de PbTx-2	Resultados								
	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3		
Dosis	UR <sub>C</sub>	MUR <sub>C</sub> /ml	µg PbTx/100g carne de mbv	UR <sub>C</sub>	MUR <sub>C</sub> /ml	µg PbTx/100g carne de mbv	UR <sub>C</sub>	MUR <sub>C</sub> /ml	µg PbTx/100g carne de mbv
0									
10									
15									
20									
80									
120									
150									
		m=			m=			m=	
		b=			b=			b=	
		r=			r=			r=	

Intervalo lineal: 0.0 a150 µg/100 g de carne MBV. Se verifica de manera visual la existencia de linealidad de los datos, y también por el factor de correlación (r). Se tiene la referencia (NOM-032-SSA1) de que la cantidad de brevetoxina de 80 µg/100 g de carne de molusco equivale a 20 UR; este valor representa un peligro para la salud publica.

#### Intervalo de trabajo.

Analista: A

Laboratorio: Microbiología

Analito: neurotoxina PbTx-2

Matriz: Carne de moluscos bivalvos

Unidades: µg

### 8.2.a Aceite de Algodón

µg de PbTx-2	µg PbTx/100g carne de mbv	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	% Recuperación
0	M1=				
	M2=				
	M3=				
10	M1=				
	M2=				
	M3=				
15	M1=				
	M2=				
	M3=				
20	M1=				
	M2=				
	M3=				
80	M1=				
	M2=				
	M3=				
120	M1=				
	M2=				
	M3=				
150	M1=				
	M2=				
	M3=				

### 8.2.b Aceite de Olivo

$\mu\text{g}$ de PbTx-2	$\mu\text{g}$ PbTx/100g carne de mbv	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	% Recuperación
0	M1=				
	M2=				
	M3=				
10	M1=				
	M2=				
	M3=				
15	M1=				
	M2=				
	M3=				
20	M1=				
	M2=				
	M3=				
80	M1=				
	M2=				
	M3=				
120	M1=				
	M2=				
	M3=				
150	M1=				
	M2=				
	M3=				

### 8.3 Límites de detección y cuantificación

Utilizando los datos promedio de  $\mu\text{g}$  PbTx/100g carne de mbv, obtenidos en la prueba de intervalo lineal para cada nivel de concentración de PbTx-2, se determina el promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $s$ ) y coeficiente de variación (CV) para cada nivel. Se calcularán asimismo la pendiente ( $m$ ), ordenada al origen ( $b$ ), coeficiente de correlación ( $r$ ) y el promedio de las desviaciones estándar.

Se calculan los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para el aceite de algodón y para el aceite de oliva:

Analista 1: A  
 Laboratorio: Microbiología  
 Analito: neurotoxina **PbTx-2**  
 Matriz: carne de moluscos bivalvos  
 Unidades: %

### 8.3.a Aceite de Algodón

µg de PbTx-2	Resultados					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	x	s	CV
0						
10						
15						
20						
80						
120						
150						

Desviación estándar promedio:

Pendiente:

Límite de detección:

Límite de cuantificación:

aplicando las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3 * s_{\text{promedio}}/m$$

$$LC = 10 * s_{\text{promedio}}/m$$

### 8.3.b Aceite de Olivo

µg de PbTx-2	Resultados					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	x	s	CV
0						
10						
15						
20						
80						
120						
150						

Desviación estándar promedio:

Pendiente:

Límite de detección:

Límite de cuantificación:

aplicando las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3 * s_{\text{promedio}}/m$$

$$LC = 10 * s_{\text{promedio}}/m$$



#### 8.4 Recuperación y sesgo.

El analista 1 preparara 6 muestras de extracto oleoso disuelto en aceite de olivo por triplicado, Estas 18 muestras se dividirán en 3 niveles las cuales se les adicionara solución de referencia de PbTx-2 con 10, 80 y 120  $\mu\text{g}$  de PbTx-2.

El analista 2 preparara 6 muestras de extracto oleoso disuelto en aceite de olivo por triplicado, Estas 18 muestras se dividirán en 3 niveles las cuales se les adicionara solución de referencia de PbTx-2 con 10, 80 y 120  $\mu\text{g}$  de PbTx-2. La variante con este analista es que realizara el ensayo en un día diferente al que lo realizo el analista 1.

Este procedimiento se repetirá de igual forma tanto para el analista 1 como para el analista 2 pero las 6 muestras por triplicado de extracto oleoso se disolverán ahora en aceite de algodón.

Se reporta el intervalo de % de recuperación y sesgo obtenidos a partir de los tres niveles de concentración.

Analista 1: A

Analista 2: B

Laboratorio: Microbiología

Analito: neurotoxina **PbTx-2**

Matriz: carne de moluscos bivalvos

Unidades: %

Nivel	$\mu\text{g}$ de PbTx-2	
	Aceite de Algodón	Aceite de Oliva
N1	10	10
N2	80	80
N3	120	120

### 8.4.a Aceite de Algodón

Muestra	% de PbTx-2 recuperado					
	N1 10		N2 80		N3 120	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1						
2						
3						
4						
5						
6						

x			
Recuperación			
Sesgo			

Intervalo de % recuperación:

Intervalo de sesgo:

### 8.4.b Aceite de olivo

Muestra	µg de PbTx-2 recuperado					
	N1 10		N2 80		N3 120	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1						
2						
3						
4						
5						
6						

x			
Recuperación			
Sesgo			

Intervalo de % recuperación:

Intervalo de sesgo:

## 8.5 Repetibilidad y reproducibilidad

Con los datos obtenidos en la prueba de % de recuperación, se calculó el promedio (x), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de % de PbTx-2 recuperado para cada nivel de PbTx-2 adicionado, de cada analista. Asimismo se calcula la repetibilidad (CVr) calculando la raíz cuadrada de la suma de cuadrados de los CV individuales y la reproducibilidad (CVR) a partir del cálculo de la desviación estándar y CV de los promedios individuales.

Se reportó el intervalo de coeficiente de variación (CVr y CVR) obtenido a partir de los tres niveles de concentración.

Analista 1: A

Analista 2: B

Laboratorio: Microbiología

Analito: neurotoxina **PbTx-2**

Matriz: Carne de moluscos bivalvos

Unidades: %

### 8.5.a Aceite de Algodón

Día	Muestra	N1 10		N2 80		N3 120	
		Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	1						
	2						
	3						
	x						
	s						
	CV						
2	4						
	5						
	6						
	x						
	s						
	CV						

CVr			
-----	--	--	--

X prom			
s			
CVR			

Intervalo de repetibilidad: %  
Intervalo de reproducibilidad: %



## 10. CRITERIOS DE ACEPTACION.

Prueba	Criterio	Referencia
Intervalo de trabajo	$r > 0.99$ para cuantificación de un contenido o ingrediente activo. Pendiente (m) Valor cercano a 1	<sup>(34)</sup> Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. Edición 2002.
Recuperación	Concentración del analito 10 a 100 µg/kg 70-120%	<sup>(35)</sup> FAO Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentration of residues and veterinary drugs. NOM-213-SSA1-2002
Repetibilidad	Concentración del analito 10 a 100 µg/kg $CV_r \leq 20\%$	<sup>(35)</sup> FAO Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentration of residues and veterinary drugs. NOM-213-SSA1-2002
Reproducibilidad	Concentración del analito 10 a 100 µg/kg $CV_R \leq 32\%$	<sup>(35)</sup> FAO Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentration of residues and veterinary drugs. NOM-213-SSA1-2002

El protocolo de validación parcial queda dispuesto como una propuesta lista para utilizarse cuando se tenga un estándar de la brevetoxina, ya que cuenta con una base muy firme y legal, puesto que todo el desarrollo de éste, está basado en las normas, además de trabajos de validación de otras toxinas (saxitoxina).

## A) ANALISIS FISICOQUÍMICO DE LOS ACEITES

Las siguientes tablas muestran los valores de los análisis fisicoquímicos de identidad y deterioro realizados al aceite de oliva y al aceite de algodón. Se realizaron tres repeticiones para cada análisis.

**Tabla 13.** Resultados del análisis fisicoquímico del aceite de algodón.

ANALISIS	ACEITE DE ALGODÓN (PROMEDIO*)	DESVIACIÓN ESTANDAR	VALOR DE REFERENCIA **
Peso específico (a 20 ° C)	0.9169	$7.78 \times 10^{-4}$	0.9150-0.9210
Índice de peróxidos (meq / Kg mtra)	3.5803	$4.10 \times 10^{-3}$	<10
Índice de acidez (% de ácido oleico)	0.037	0.076	≤0.2
Índice de Yodo ( % )	123.39	1.039	109-120
Índice de Refracción (a 20 °C)	1,470.96	0.047	1,465-1,470
Índice de Saponificación (mg KOH / g mtra.)	195.893	1.197	190-198
Índice de Kreis	Negativo	--	--

\*promedio de 3 repeticiones

Los valores experimentales obtenidos son comparados con los valores teóricos reportados en la Farmacopea Mexicana, (\*\*tabla 12).

**Tabla 14.** Resultados del análisis fisicoquímico del aceite de olivo.

ANALISIS	ACEITE DE OLIVO (PROMEDIO*)	DESVIACIÓN ESTANDAR	VALOR DE REFERENCIA **
Peso específico (g/ml) (a 20 ° C)	0.9135	$8.33 \times 10^{-4}$	0.9100-0.9150
Índice de peróxidos (meq / Kg mtra)	2.4882	0.082	<10
Índice de acidez (% de ácido oleico)	0.040	0.066	$\leq 0.2$
Índice de Yodo ( % )	101.9	0.445	79-88
Índice de Refracción (a 20 °C)	1466.83	0.094	1,463-1,472
Índice de Saponificación (mg KOH / g muestra)	198.51	0.222	190-195
Índice de Kreis	Negativo	--	--

\*promedio de 3 repeticiones

Los valores experimentales obtenidos son comparados con los valores teóricos reportados en la Farmacopea Mexicana, (\*\*tabla 12).

En las siguientes tablas se encuentran los resultados de la cromatografía de gas que se realizó a los aceites de algodón y oliva para observar la composición de sus ácidos grasos y compararla con la bibliografía (Anexo E).

**Tabla 15.** Resultados del perfil de ácidos grasos del aceite de algodón.

ACIDOGRASO		ACEITE DE ALGODÓN	
		DATOS EXPERIMENTALES DE C. G. (%)	VALOR DE REFERENCIA ** (%)
E 14.	Mirístico	0.98	0.4-2.0
E 16	Palmítico	21.26	17-31
E 16:1	Palmitoleico	0.67	0.5-2.0
E 18	Esteárico	2.79	1.0-4.0
E 18:1	Oleico	19.76	13-44
E 18:2	Linoleico	51.83	33-59
E 18:3	Linolénico	0.33	0.1-2.1
E 20	Araquídico	--	Menor a 0.7
E 20:1	Gadoleico	--	Menor a 0.5

\*\*Los valores experimentales obtenidos son comparados con los valores teóricos reportados en la Farmacopea Mexicana. <sup>(37)</sup>



**Tabla 16.** Resultados del perfil de ácidos grasos del aceite de olivo.

ACIDO GRASO		ACEITE DE OLIVO	
		DATOS EXPERIMENTALES DE C. G. (%)	VALOR DE REFERENCIA ** (%)
E 14	Mirístico	--	0-0.05
E 16	Palmítico	12.06	7.5-20.0
E 16:1	Palmitoleico	1.10	0.3-3.5
E 18	Estearico	3.28	0.5-3.5
E 18:1	Oleico	73.21	56.0-83.0
E 18:2	Linoleico	6.28	3.5-20.0
E 18:3	Linolénico	0.60	0.0-1.5
E 20	Araquídico	--	Trazas
E 20:1	Gadoleico	0.24	Trazas

\*\*Los valores experimentales obtenidos son comparados con los valores teóricos reportados en la Farmacopea Mexicana. <sup>(37)</sup>

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

### A)ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

#### PESO ESPECIFICO

El peso específico es la principal característica del aceite de oliva que se tomó en cuenta para considerarlo como sustituto del aceite de algodón, una de las causas que se optó por este aceite es que su densidad es muy parecida a la del aceite de algodón y por lo tanto cuando se diluyó la toxina en el aceite y se inoculó a los ratones no se presentaba diferencia al hacerlo, el valor teórico de referencia concuerda con el experimental presentándose un valor un poco más alto en el aceite de algodón que en el aceite de oliva, esto puede representar una cierta ventaja sobre el aceite de algodón ya que tendría menor resistencia en cuanto a fluidez cuando se inocule en los ratones. Es importante considerar también que un compuesto para ser transportado al interior de una célula, tiene que atravesar membranas, las cuales están constituidas por una capa de lípidos, entonces la forma no ionizada (liposoluble) de un compuesto tiene mayor posibilidad de pasar por las membranas y en consecuencia su eliminación será más difícil.

#### INDICE DE YODO

El aceite de algodón tiene al ácido linoleico como predominante y este ácido graso se caracteriza por tener dos insaturaciones en su estructura química. Mientras que el aceite de oliva tiene como ácido predominante el ácido graso oleico que cuenta con una insaturación.

Los datos teóricos concuerdan ya que el aceite de algodón presenta un valor mayor en cuanto al índice de yodo, que el aceite de oliva, aunque no caen dentro del rango teórico, esto puede deberse a las condiciones o cambios climáticos presentes durante su cultivo existen variaciones en la cosecha y en la composición de todos sus derivados incluyendo los aceites.

Como se conoce a mayor número de insaturaciones en un aceite, mayor índice de yodo esto justifica que el aceite de algodón tenga una I. Y. mayor que el aceite de oliva.

## **INDICE DE REFRACCIÓN**

Este índice está relacionado con la composición del aceite y su pureza y es característico para cada aceite. Además de que tiene relación con el peso molecular y grado de insaturación. El aceite de algodón tiene un mayor grado de insaturación eso se ve reflejado en su índice de refracción, a diferencia del aceite de oliva en el que predomina los ácidos grasos monoinsaturados por lo tanto su índice de refracción es menor.

## **INDICE DE SAPONIFICACIÓN**

Esta prueba se basa en la reacción química que se lleva a cabo bajo condiciones establecidas, entre los ácidos grasos totales contenidos en un producto dado y una solución alcohólica de hidróxido de potasio. Como productos de reacción se obtienen las sales derivadas de los ácidos correspondientes. Refleja el peso molecular promedio de los ácidos grasos en una relación inversa. El aceite de algodón tiene un índice de saponificación menor que el de aceite de oliva a partir de esto puede considerarse entonces que el promedio del peso molecular que tiene es mayor que el del aceite de oliva por que tiene una relación inversa.

La cantidad de ácidos grasos en los dos aceites es similar dado que su índice de saponificación tiene muy poca diferencia.

## **INDICE DE PEROXIDOS**

El índice de peróxidos mide el grado de oxidación de un aceite aún antes de que sea detectado organolépticamente, denominada autooxidación que es un proceso de oxidación lento inducido por el aire a temperatura ambiente, en el que reacciona el oxígeno con los ácidos grasos insaturados (dobles ligaduras) dando como productos que inicialmente se forman peróxidos que se descomponen en hidrocarburos, aldehídos y cetonas, estos compuestos formados por la autooxidación son muy tóxicos y en caso de formarse en los aceites en estudio representarían una interferencia durante el ensayo biológico de la brevetoxina. Sin embargo los datos experimentales muestran dos cosas: primero que el valor de peróxidos en el aceite de algodón es un poco mayor que en el aceite de oliva, esto es justificable desde el punto de vista de que este aceite tiene un mayor número de dobles enlaces que pueden reaccionar con el oxígeno produciéndose la autooxidación, y segundo los

valores de peróxidos para los dos aceites tanto de algodón como de olivo están dentro de los límites  $<10$  meq/Kg muestra.

### **INDICE DE ACIDEZ**

El índice de acidez mide la reacción de hidrólisis de los triglicéridos que integran un aceite descomponiéndose en ácidos grasos libres y glicerina. Esta reacción es producida por agua o por lipasas que se encontraran presentes. Los datos experimentales aportan información de que los dos aceites caen dentro de la especificación teórica, y desde el punto de vista de deterioro este no es significativo por que el valor experimental es muy bajo.

### **INDICE DE KREIS**

El índice de Kreis es un dato que nos indica el deterioro de un aceite, en este caso la reacción fue cualitativa, es decir no se presento coloración (rosa) en ambos aceites, lo cual indica que es negativa, no existe presencia de manoldehído, un producto resultado del deterioro de los aceites.

Ahora si comparamos los valores experimentales de los análisis de composición de los aceites de algodón y de aceite de olivo se puede observar poca diferencia entre ellos, esto se demostrará al realizar el protocolo de validación al evaluar a cada aceite con los parámetros de desempeño.

En cuanto a los análisis de deterioro en ellos se puede observar que no existe deterioro de los aceites al caer dentro de los rangos aceptables para que no existan sustancias que puedan afectar la toxicidad del aceite.

### **PERFIL DE ACIDOS GRASOS**

En ambas tablas se puede observar que los valores experimentales del análisis de ácidos grasos del aceite de oliva y del aceite de algodón cae dentro del rango reportado por la farmacopea mexicana.

Los resultados reflejados en estas tablas son congruentes con los resultados fisicoquímicos efectuados a los dos aceites.

## **B) BIOENSAYO**

De los resultados arrojados durante el periodo de experimentación del bioensayo no se registraron muestras positivas para brevetoxina marina.

Sin embargo al realizarse un cambio de un reactivo por otro requiere validarse el método para asegurar que cumple con el objetivo por el cual fue creado. Existen pocos protocolos establecidos para los métodos biológicos, en este estudio se plantea un protocolo de validación parcial en el cual se considera la existencia de un estándar para brevetoxina (PbTx-2) para tener resultados en unidades cuantitativas como son  $\mu\text{g}$  de PbTx-2 y no unidades ratón (UR).

## **C) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

Debido a las variables no cuantitativas del método biológico es difícil tener un control sobre ellas para hacer la validación del método, sin embargo si se considera la existencia de un estándar para la brevetoxina PbTx-2 se puede plantear el protocolo de validación parcial trabajando con parámetros de desempeño como son intervalo lineal y de trabajo, límites de detección y cuantificación, recuperación y sesgo, así como repetibilidad y reproducibilidad, realizándoles un análisis estadístico y aplicando los criterios de aceptación nos daría como resultado que no existe diferencia significativa entre el uso del aceite de algodón aceite de olivo.

## CONCLUSIONES

Se realizó la determinación de la brevetoxina marina en moluscos bivalvos provenientes del Golfo de México, siguiendo la metodología oficial (APHA, 1970) y de manera paralela sustituyendo el aceite de algodón por el aceite de olivo, dando como resultado:  $<20$  UR/ 100 g de muestra, para la brevetoxina marina en este periodo de tiempo con ambas determinaciones.

Se planteó el protocolo de validación para la determinación de la brevetoxina marina utilizando al aceite de olivo como vehículo como método alternativo al método oficial, quedando como una propuesta para ser utilizada en caso de contar con el estándar de la brevetoxina marina.

Los análisis fisicoquímicos realizados a los aceites de algodón y olivo dieron resultados muy similares lo que sirvió de base para trabajar con el aceite de olivo en el bioensayo y lo cual se reflejó al realizar el experimento sin ningún problema.

Dados los resultados obtenidos en este experimento no se encontró diferencia entre la inoculación con aceite de oliva y con aceite de algodón, en fase de no contingencia por brevetoxina, sería recomendable e interesante realizar el bioensayo cuando el límite de brevetoxina sobrepase las 20 UR/100 g de muestra, para observar el comportamiento del aceite de prueba (aceite de oliva).

## ANEXO A

### DEFINICIÓN DE BIOENSAYO:

Un bioensayo es un procedimiento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material (o de un proceso), por medio de la reacción que sigue a su aplicación en la materia viva.

Los ensayos biológicos se dividen en ensayos cualitativos y ensayos cuantitativos.

Los ensayos cualitativos, son los que se pretende por ejemplo identificar una sustancia, por medio de una reacción característica producida en una especie particular de entidad biológica.

Los ensayos cuantitativos, son semejantes a los métodos de medición física o de análisis químico cuantitativo, en que conducen a una determinación numérica de alguna propiedad del material ( o proceso ) por ser ensayado.

El propósito de un ensayo biológico cuantitativo, es determinar la concentración de una sustancia, en una preparación, midiendo la actividad en un sistema biológico.

La característica distintiva de los ensayos biológicos cuantitativos, es que la aplicación de estímulos idénticos a la materia viva, da lugar a respuestas que pueden variar de un animal a otro, aun cuidando otras variables como son peso, cepa, etc. <sup>(36)</sup>

Dentro de los usos que se le pueden dar a los animales de laboratorio tenemos:

- Acción de fármacos (efectos, toxicidad, irritabilidad en piel, seguridad, etc.)
- Efectos toxicológicos de ciertas sustancias.

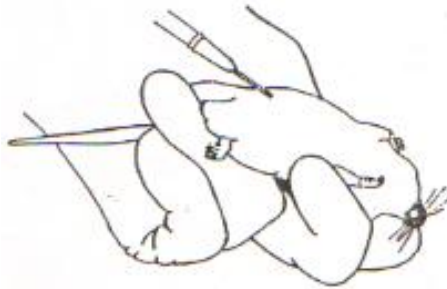
Dentro de las especies mas utilizadas de animales de laboratorio se encuentra el ratón, debido a su gran sensibilidad, fácil manipulación y bajo costo de mantenimiento, permitiendo el uso de un mayor número de animales por grupo.

La forma más comúnmente utilizada para administrar la sustancia en prueba en esta especie es la vía intraperitoneal. <sup>(22)</sup>

## VÍA INTRAPERITONEAL

Es una vía parenteral que consiste en aplicar en la cavidad peritoneal el medicamento o sustancia a estudiar, para lo cual la zona abdominal se divide imaginariamente en cuatro secciones (Fig. 12), aplicando la inyección en cualquiera de los dos cuadrantes o regiones posteriores, inclinando el animal hacia el cráneo e introduciendo la aguja en un ángulo aproximado de 35° (para no tocar las vísceras y causar una peritonitis mortal).

Esta vía ofrece la ventaja de poder administrar relativamente grandes volúmenes, y por la rápida absorción que presenta. Se utiliza aguja con calibre 25, 27 o 29. <sup>(22)</sup>



**Fig. 12** Inoculación intraperitoneal



## CALIDAD DE LOS ANIMALES PARA LABORATORIO

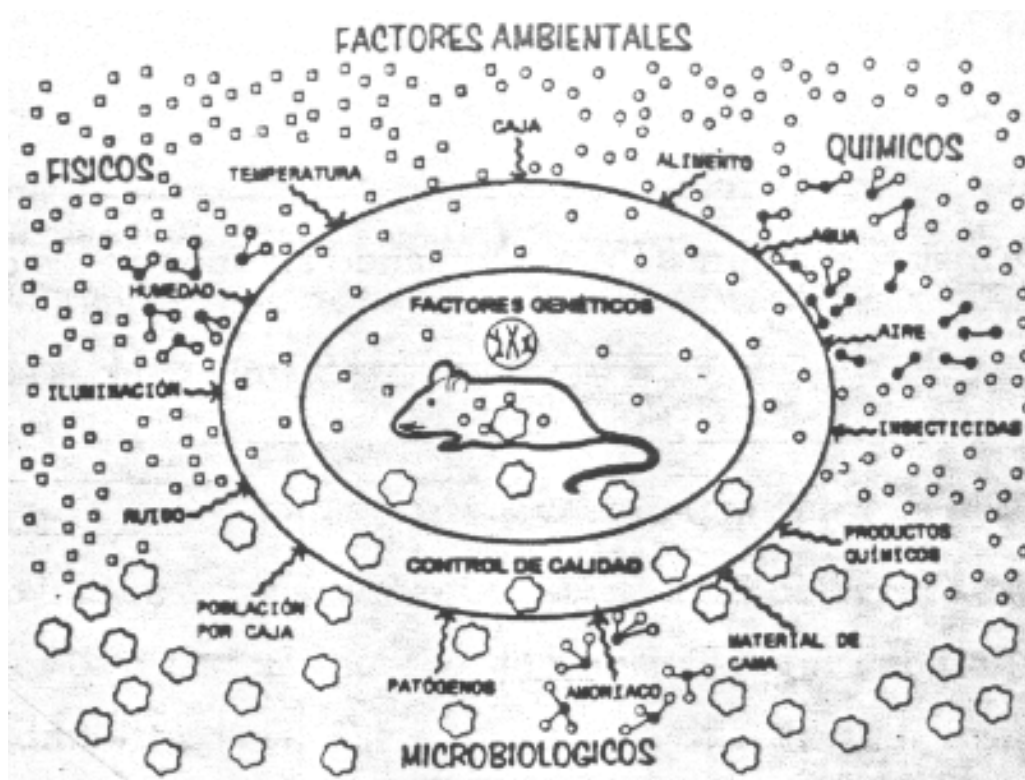
La calidad de los animales de laboratorio está dada en función de los factores ambientales (ver fig. 10) que lo rodean y su estado nutricional y microbiológico, el cual se puede conocer mediante prácticas periódicas de control dentro del bioterio.

Estas prácticas pueden ser:

Control de calidad de los principales insumos

Control de calidad del medio ambiente

Control de calidad de los animales.



**Fig. 13** Factores ambientales

Para controlar los insumos se debe tener un buen monitoreo de calidad en el agua y el alimento de los animales, los cuales deben estar libres de cualquier clase de contaminación y con los requerimientos necesarios.

El medio ambiente de los animales, debe estar controlado, tener una temperatura, humedad, cantidad e intensidad de ciclos de luz determinados.

En las cajas debe haber un material de “cama” adecuado, con períodos frecuentes de cambios de la misma y limpieza de las cajas, la cantidad o número de animales en ellas debe ser el adecuado para permitir libertad de movimiento y bienestar de los animales que ahí permanezcan, etc.

El control de calidad de los animales va a estar dado por programas de monitoreo periódicos tomando peso, talla y aspecto en general.

### **CEPA**

Cepa es el conjunto de características genóticas y fenotípicas que se obtienen y conservan después de 20 cruas consanguíneas (padres con hijos, hermanos con hermanas, etc.).<sup>(22)</sup>

## ANEXO B

**Tabla 17.** Corrección de peso del ratón

PESO DE RATÓN (GRAMOS)	UNIDADES RATÓN (F.C.)	PESO DE RATÓN (GRAMOS)	UNIDADES RATÓN (F.C.)
10	0.50	17	0.88
10.5	0.53	17.5	0.905
11	0.56	18	0.93
11.5	0.59	18.5	0.95
12	0.62	19	0.97
12.5	0.65	19.5	0.983
13	0.675	20	1.000
13.5	0.70	20.5	1.015
14	0.73	21	1.3
14.5	0.76	21.5	1.04
15	0.785	22	1.05
15.5	0.81	22.5	1.06
16	0.84	23	1.07
16.5	0.86		

**Tabla 18.** Relación de dosis, tiempo de muerte y peso de ratones inyectados con brevetoxina extraída de MBV.

TIEMPO DE MUERTE (minutos)	UNIDADES RATÓN / ml (UR/ml)	CORRECCIÓN POR PESO DE RATÓN	
		Peso de Ratón (gramos)	Factor de corrección
8	10.0	10	0.39
10	9.0	11	0.45
12	8.0	12	0.51
14	7.0	13	0.57
16	6.0	14	0.63
18	5.0	15	0.69
20	4.5	16	0.75
30	4.0	17	0.81
38	3.8	18	0.87
45	3.6	19	0.94
60	3.4	20	1.00
83	3.2	21	1.06
105	3.0	22	1.12
140	2.8	23	1.18
180	2.6	24	1.24
234	2.4	25	1.30
300	2.2	26	1.36
360	2.0	27	1.39
435	1.8	28	1.41
540	1.6	29	1.42
645	1.4	30	1.43
780	1.2	-	-
930	1.0	-	-

## ANEXO C

### Materiales y reactivos utilizados en el bioensayo.

- **Materiales**
  - a) Licuadora
  - b) Balanza analítica
  - c) Centrífuga con porta tubos con una capacidad de 250 ml
  - d) Baños de vapor
  - e) Campana de extracción
  - f) Embudo de separación de 1000 ml
  - g) Vasos de 400 y 100 ml
  - h) Jeringas de 3 ml con agujas del número 23
  - i) Pipetas de 10 ml
  - j) Reloj o cronómetro
  - k) Cajas para los roedores
- **Reactivos**
  - a) Ácido clorhídrico concentrado (12 N)
  - b) Cloruro de Sodio (grado reactivo)
  - c) Éter dietílico
  - d) Aceite de oliva ( $\delta= 0.9135$ )
  - e) Aceite de algodón ( $\delta= 0.9169$ )
- **Animales de prueba**

Ratones sanos con un peso de 19-21.0 g, sin embargo los ratones no deben ser menores de 10 g ni mayores de 25 g. No se deben volver a usar los mismos ratones. Cepa NIH certificada.

El número de muestras de extracto graso de moluscos se rotulo con número y letra por lo que se dividió en dos partes para hacer 60 determinaciones con aceite de oliva y 60 determinaciones con aceite de algodón.

A: Aceite de Oliva

B: Aceite de Algodón

TND: Toxina no detectable.

## ANEXO D

**Tabla 19.** Resultados experimentales del bioensayo

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inocular	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>1 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.6 19.6 19.8	13:15 13:16 13:17	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>1 B</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	20.1 19.9 20.0	13:10 13:12 13:14	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>2 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.1 19.9 19.9	13:19 13:20 13:21	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>2 B</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.0 19.8 19.7	12:10 12:12 12:14	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>3 A</b>	cb. morado l. morado cl. morado	19.1 19.3 19.2	12:15 12:17 12:20	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>3 B</b>	cb. negra l. negro cl. negra	19.6 19.9 20.0	12:22 12:23 12:24	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>4 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.6 19.6 19.8	13:15 13:16 13:17	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>4 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.2 20.4 20.3	13:18 13:20 13:22	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>5 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.1 19.9 19.9	13:19 13:20 13:21	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>5 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.2 20.5 20.6	13:08 13:10 13:12	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>6 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.1 19.9 20.5	13:16 13:17 13:18	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>6 B</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	20.1 20.1 20.1	13:12 13:13 13:14	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>7 A</b>	cb. morado l. morado cl. morado	21.4 21.4 21.4	11.16 11.17 11.19	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>7 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.2 20.7 20.9	13.15 13.16 13.17	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>8 A</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.6 19.0 19.7	13.44 13.45 13.46	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>8 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.2 20.1 19.9	13.23 13.24 13.25	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>9 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.1 20.3 20.0	11.22 11.24 11.25	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>9 B</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.5 19.7 19.6	12.56 12.57 12.58	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>10 A</b>	cb. negra l. negro cl. negra	20.4 20.0 19.5	13.47 13.48 13.49	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>10 B</b>	cb. amarilla l. amarillo cl. amarilla	20.4 20.0 20.0	10.40 10.41 10.42	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>11 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.0 19.0 20.5	13.38 13.39 13.40	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>11 B</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.9 19.9 19.9	10.43 10.44 10.45	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>12 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.7 20.1 19.8	11.45 11.47 11.49	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>12 B</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.4 20.2 20.1	10.45 10.46 10.47	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>13 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.4 20.2 19.4	11:50 11:51 11:52	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>13 B</b>	cb. negra l. negro cl. negra	20.4 20.3 20.6	13:00 13:01 13:03	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>14 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	19.3 19.4 19.6	12:05 12:06 12:07	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>14 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.4 20.4 20.1	13:04 13:05 13:06	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>15 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.2 19.3 19.6	12:08 12:09 12:10	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>15 B</b>	cb. verde l. verde cl. verde	19.8 19.3 19.4	13:08 13:09 13:10	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>16 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	19.9 20.1 20.1	12:11 13:13 13:15	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>16 B</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	20.1 19.9 19.8	11:53 11:54 11:55	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>17 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	19.2 19.0 19.3	12:16 12:18 12:19	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>17 B</b>	cb. amarillo l. amarillo cl. amarillo	19.4 19.7 19.6	12:50 12:51 12:52	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>18 A</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.5 19.5 19.5	12:20 11:22 11:24	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>18 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	19.1 19.1 19.6	11:56 11:57 11:58	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g



Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>19 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.0 19.9 20.1	13:55 13:57 13:59	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>19 B</b>	cb. negro l. negro cl. negro	19.8 19.3 19.2	11:59 12:00 12:01	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>20 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.8 20.9 19.5	14:02 14:04 14:06	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>20 B</b>	cb. amarillo l. amarillo cl. amarillo	21.6 21.4 21.6	13:40 13:43 13:45	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>21 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.0 19.9 19.8	14:08 14:10 14:12	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>21 B</b>	cb. verde l. verde cl. verde	19.2 19.3 19.6	13:00 13:02 13:04	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>22 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.0 19.9 19.8	13:47 13:49 13:50	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>22 B</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	20.3 20.8 20.9	12:45 12:47 12:50	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>23 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	19.8 19.7 19.8	13:51 13:52 13:53	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>23 B</b>	cb. morado l. morado cl. morado	20.5 20.5 20.7	13:06 13:07 13:08	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>24 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	21.0 19.3 19.3	14:07 14:08 14:09	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>24 B</b>	cb. negro l. negro cl. negro	20.4 20.2 20.6	12:51 12:53 12:55	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>25 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.8 20.6 20.8	13:55 13:56 13:57	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>25 B</b>	cb. café l. café cl. café	19.9 19.6 19.5	13:10 13:11 13:12	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>26A</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.8 19.9 20.0	13:59 14:01 14:02	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>26 B</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.6 20.5 20.8	12:56 12:57 12:59	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>27 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	19.7 20.1 20.2	13:40 13:41 13:42	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>27 B</b>	cb. morado l. morado cl. morado	20.5 20.5 20.4	13:14 13:15 13:16	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>28 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.4 19.1 19.1	11:53 11:54 11:55	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>29 B</b>	cb. verde l. verde cl. verde	20.1 20.6 20.0	12:15 12:17 12:18	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>30 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	19.8 19.5 19.6	13:51 13:52 13:53	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>30 B</b>	cb. café l. café cl. café	20.3 20.3 20.5	12:31 12:33 12:35	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>31 A</b>	cb. negro l. negro cl. negro	19.6 20.0 19.8	13:55 13:57 13:59	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>31 B</b>	cb. morado l. morado cl. morado	20.3 19.7 19.9	11:53 11:54 11:55	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>32 A</b>	cb. negro l. negro cl. negro	19.5 19.3 19.6	12:53 12:54 12:55	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>32 B</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.8 20.6 20.6	12:18 12:20 12:21	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>33 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.1 20.0 19.8	12:57 12:59 13:01	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>33 B</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.2 20.3 20.5	12:22 12:23 12:25	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>34 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.7 20.5 20.4	13:35 13:37 13:39	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>34 B</b>	cb. morado l. morado cl. morado	20.0 20.5 20.2	12:22 12:23 12:25	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>35 A</b>	cb. roja l. rojo cl. roja	20.1 20.3 19.9	12:48 12:50 12:51	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>35 B</b>	cb. café l. café cl. café	19.7 19.5 20.0	12:26 12:28 12:29	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>36 A</b>	cb. verde l. verde cl. verde	19.0 19.0 19.0	13:11 13:12 13:13	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>36 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.8 20.9 20.9	12:27 12:29 12:31	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>37 A</b>	cb. café l. café cl. café	19.3 19.5 19.2	11:55 11:56 11:57	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>37 B</b>	cb. azul l. azul cl. azul	19.7 19.7 19.7	11:22 11:23 11:24	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
38 A	cb. roja l. rojo cl. roja	19.9 20.1 20.2	11:19 11:20 11:21	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
38 B	cb. morado l. morado cl. morado	19.2 19.4 19.4	11:58 11:59 12:00	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
39 A	cb. verde l. verde cl. verde	20.6 20.8 20.9	11:16 11:17 11:18	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
39 B	cb. negro l. negro cl. negro	20.0 20.0 20.8	11:25 11:26 11:27	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
40 A	cb. amarillo l. amarillo cl. amarillo	20.0 20.5 20.1	11:13 11:14 11:15	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
40 B	cb. azul l. azul cl. azul	19.4 19.9 19.6	12:01 12:02 12:03	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
41 A	cb. café l. café cl. café	19.3 19.7 19.8	12:01 12:03 12:05	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
41 B	cb. verde l. verde cl. verde	19.4 19.5 19.4	12:00 12:01 12:02	12:15 +24 h +24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
42 A	cb. roja l. rojo cl. roja	20.0 20.2 20.2	12:07 12:09 12:11	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
42 B	cb. negro l. negro cl. negro	19.4 19.7 19.4	12:05 12:06 12:07	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
43 A	cb. morado l. morado cl. morado	19.9 19.8 19.9	12:13 12:15 12:17	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
43 B	cb. azul l. azul cl. azul	19.4 19.8 19.4	12:09 12:10 12:11	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
44 A	cb. amarillo l. amarillo cl. amarillo	20.4 20.1 20.4	12:19 12:21 12:23	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
44 B	cb. naranja l. naranja cl. naranja	20.2 19.8 19.7	12:13 12:14 12:15	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
45 A	cb. morado l. morado cl. morado	19.7 20.0 20.0	11:55 11:57 11:59	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
45 B	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.8 20.1 20.1	12:01 12:03 12:04	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
46 A	cb. café l. café cl. café	20.3 20.0 20.1	12:05 12:07 12:09	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
46 B	cb. roja l. rojo cl. roja	19.2 19.5 19.7	12:11 12:13 12:15	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
47 A	cb. negro l. negro cl. negro	20.2 20.0 20.0	12:00 12:03 12:05	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
47 B	cb. roja l. rojo cl. roja	20.1 20.3 20.4	12:07 12:08 12:10	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
48 A	cb. morado l. morado cl. morado	20.2 20.0 20.0	12:11 12:12 12:13	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
48 B	cb. verde l. verde cl. verde	19.7 19.4 19.5	12:15 12:17 12:18	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
49 A	cb. verde l. verde cl. verde	20.2 20.2 20.2	11:35 11:37 11:39	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
49 B	cb. roja l. rojo cl. roja	20.6 20.3 20.7	11:41 11:43 11:45	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

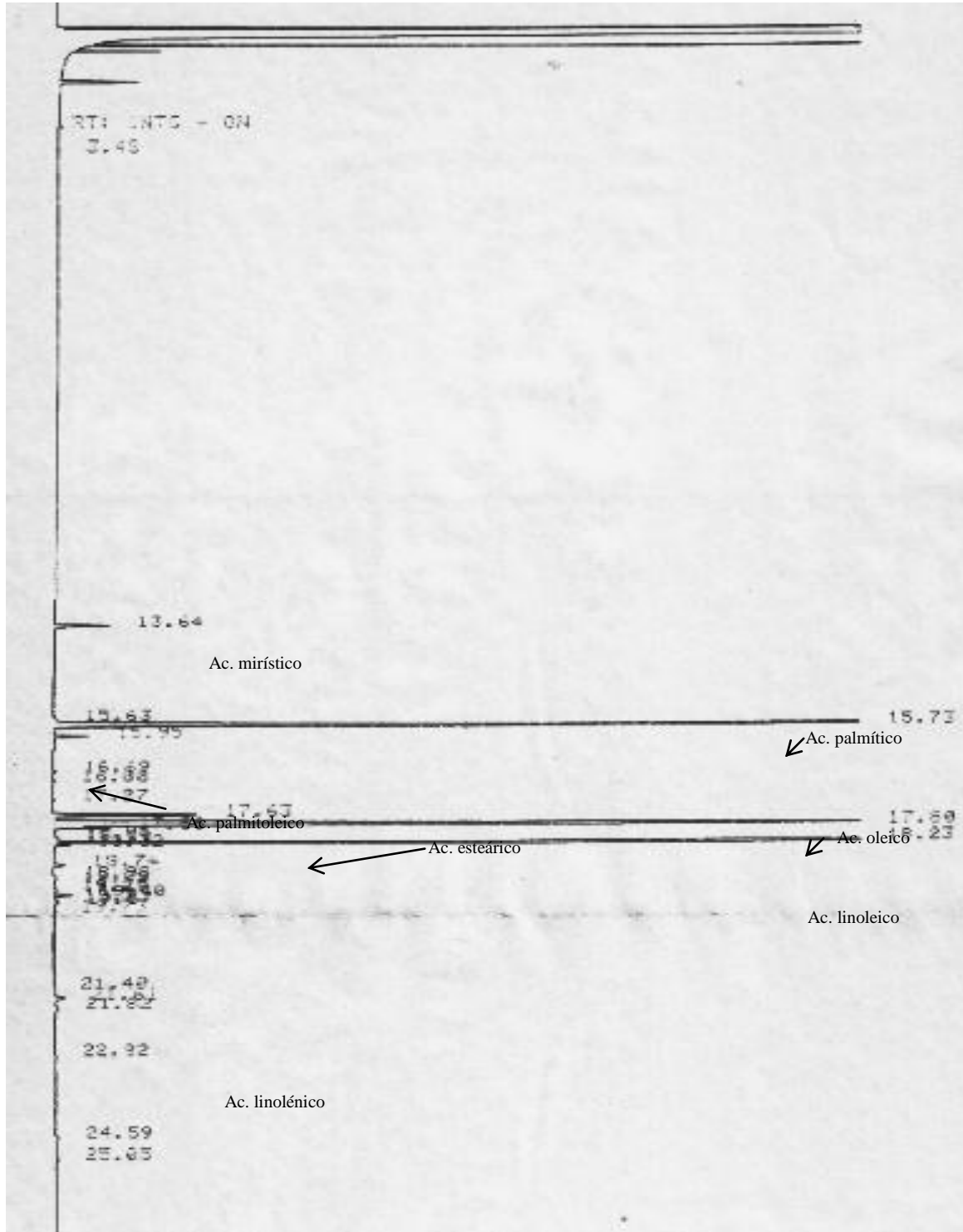
Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inoculo	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
50 A	cb. morado l. morado cl. morado	20.2 20.3 20.3	11:40 11:42 11:44	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
50 B	cb. negro l. negro cl. negro	19.9 19.7 19.9	11:46 11:48 11:50	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
51 A	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.8 19.4 19.2	11:42 11:44 11:46	+24 h +24 h 11:48	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
51 B	cb. verde l. verde cl. verde	20.1 20.2 20.0	11:37 11:39 11:41	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
52 A	cb. café l. café cl. café	19.6 19.9 19.8	11:48 11:50 11:52	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
52 B	cb. morado l. morado cl. morado	19.9 19.6 19.5	11:42 11:43 11:45	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
53 A	cb. verde l. verde cl. verde	20.5 19.6 20.4	11:54 11:55 11:56	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
53 B	cb. café l. café cl. café	20.9 20.7 20.4	11:47 11:51 11:53	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
54 A	cb. roja l. rojo cl. roja	20.7 20.3 21.0	11:57 11:58 12:00	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
54 B	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.8 20.0 20.3	11:55 11:57 12:00	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
55 A	cb. morado l. morado cl. morado	20.0 20.0 20.2	10:50 10:52 10:54	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
55 B	cb. amarillo l. amarillo cl. amarillo	19.8 19.5 19.9	10:56 10:58 10:59	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

Clave	Marca	Peso (g)	Tiempo de inocular	Tiempo de muerte	Diferencia (min)	U. R.	U. peso	UR c	MURc	Resultado
<b>56 A</b>	cb. café l. café cl. café	20.2 20.3 20.7	11:10 11:12 11:14	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>56 B</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.8 19.6 20.0	11:16 11:18 11:20	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>57 A</b>	cb. azul l. azul cl. azul	20.3 20.1 20.4	10:20 10:22 10:25	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>57 B</b>	cb. negro l. negro cl. negro	19.9 20.1 19.8	10:27 10:28 10:30	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>58 A</b>	cb. café l. café cl. café	19.3 19.0 19.0	12:00 12:02 12:04	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>59 B</b>	cb. verde l. verde cl. verde	21.0 19.2 19.4	12:06 12:08 12:10	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>60 A</b>	cb. naranja l. naranja cl. naranja	19.7 19.4 19.0	12:00 12:02 12:04	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g
<b>60 B</b>	cb. morado l. morado cl. morado	19.0 19.2 19.0	12:06 12:08 12:10	+24 h	+930	1.0	1.0	1.0	1.0	TND <10 UR/100g

## ANEXO E

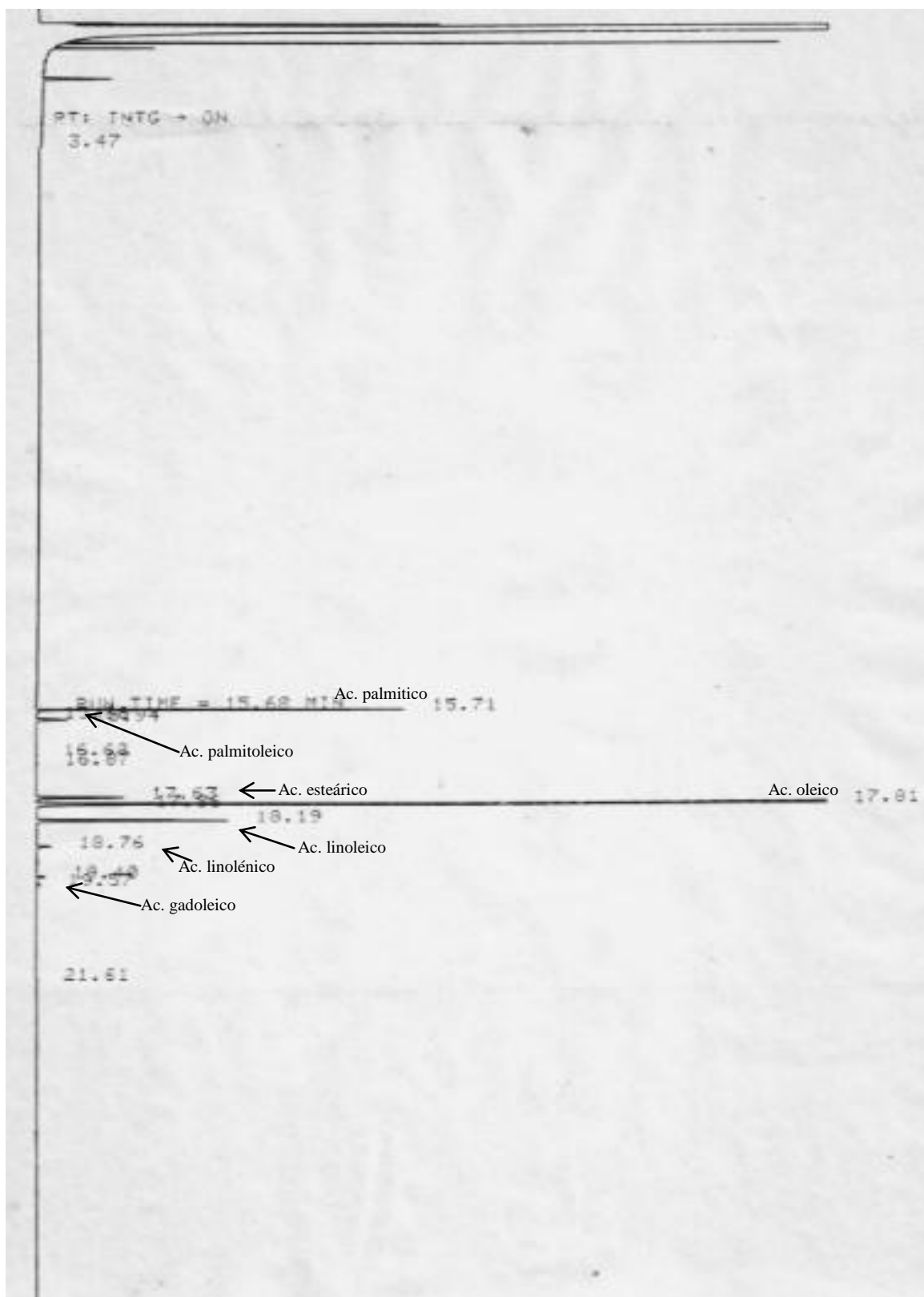
### PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE LOS ACEITES

Fig. 14 Cromatograma del Aceite de Algodón.





**Fig 15.** Cromatograma del Aceite de Oliva



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cortes, A. R.-Las mareas rojas; Editorial AGT, México D.F. (1998), pag. 1-7,33-39,43,62-63,104-105.
- (2) Barbera, S. A.- Generalidades sobre la intoxicación paralizante, Órgano informativo y científico, Venezuela, Año 3- Vol. 3, No.2, Abril 1992
- (3) <http://www.conabio.gob.mx>
- (4) Barbera, S. A.-II Curso Internacional de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, Republica Bolivariana de Venezuela, noviembre 2001.
- (5) <http://www.tamaulipas.gob.mx/sedeem/sectores/pesca/marea-roja.htm>.
- (6) <http://www.cofepris.gob.mx>
- (7) <http://es.wikipedia.org/wiki/Dinoflagelados>
- (8) Klaassen, D. C.- Manual de Toxicología, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, E.U. (1999), pag. 889.
- (9) Poli A. Radioimmunoassay for PbTx-2-Type Brebetoxins: Etiope Specificity of Two Anti-PbTx Sera. Journal AOAC International, Vol 78, No. 2, pag. 538-540, 1995.
- (10) <http://www.fao.org>
- (11) Baden G. D.- Modified Immunoassays for Polyeter Toxins. Journal AOAC International, Vol 78, No. 2, pag. 499-508.1995.
- (12) Strayer L. Bioquímica, 4° Ed. Tomo I, Editorial Reverte, NY, E.U. (1995), pag. 297, 301.
- (13) Concon J. M., Food Toxicology, Inc., 270 Madixon Avenue, New York, N.Y (1998).
- (14) Mebs Dietrich, Scientific Publishers, vol. 24, No. 1, pag 152-155.
- (15) Cembella, A.D., Milenkovic, L., Doucette, G., Fernandez, M. 1995. *In Vitro* biochemical and cellular assays. In Hallegraef, G.M., Anderson, D.M. & A.D. Cembella, eds. *Manual on harmful marine microalgae*. IOC Manuals and Guides No.33. UNESCO.

- (16) Fleming, L.E. & Baden, **D.G.** 1999. Florida Red Tide and Human Health: Background (available at [www.redtide.who.edu/hab/illness/floridaredtide.html](http://www.redtide.who.edu/hab/illness/floridaredtide.html)).
- (17) Tibbets, J. 1998. Toxic Tides. *Environ Health Perspect* 106(7): A326-A331.
- (18) Norma Oficial de Emergencia.- NOM-EM-005-SSA1-2001, Salud Ambiental.
- (19) Watters, M.R. 1995. Review article. Organic neurotoxins in seafoods. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 97: 119-124.
- (20) Howard R. R.- Sanidad Alimentaria, Editorial Acribia, Zaragoza España (1996) pag. 172-174.
- (21) [http://sesver.ssaver.gob.mx/portal/docs/PAGE/INICIO/REGULACION\\_Y\\_FOMENTO\\_SANITARIO/MAREA\\_ROJA/MUESTREODEMAREARROJA.PDF](http://sesver.ssaver.gob.mx/portal/docs/PAGE/INICIO/REGULACION_Y_FOMENTO_SANITARIO/MAREA_ROJA/MUESTREODEMAREARROJA.PDF)
- (22) Gómez A. E., Naranjo E., Manual para el uso y manejo de la rata y el ratón como animales de laboratorio, 2° Ed., Facultad de Química, UNAM, (2001).
- (23) <http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pdf/calwestmed00412-0026.pdf>
- (24) <http://espanol.cottonsed.com>
- (25) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo I, Secretaria de Salud, México (2000), pag. 465, 469-470.
- (26) Métodos Oficiales de Análisis de los Alimentos, Mundi-Prensa libros, S.A. Madrid España 1994.
- (27) Pearson D.- Técnicas de Laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza España (1998).
- (28) Lees R., Análisis de Alimentos, Editorial Acribia, 2° edición, Zaragoza, España (1999).
- (29) Iturbe C. F.- Manual de Laboratorio de Análisis de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- (30) Reinhard N., Análisis de los Alimentos, Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España) 1998.
- (31) Recommended Procedures for the examination of Sea water and shellfish, Fourth edition 1970 American Public Health Association, Inc. 1740 Broadway, New York, N. Y. 10019.
- (32) Norma ISO: ISO/IEC 17025

- (33) Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos en conserva. Especificaciones sanitarias.
- (34) Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. Edición 2002.
- (35) FAO Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentration of residues and veterinary drugs. NOM-213-SSA1-2002.
- (36) Valle P, Lucas F., Toxicología de Alimentos, INSP, Centro Nacional de Salud Ambiental, México, D. F. (2000), pag. 26-32.
- (37) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo II, Secretaria de Salud, México (2000), pag. 1837-1838.