

Validación de una técnica para la determinación de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos de Costa Rica mediante cromatografía líquida acoplada a reactor post columna con detector de fluorescencia

Validation of a post – column reactor liquid chromatography and fluorescence detection method for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs from Costa Rica

Karla Rojas-Arrieta¹, Yajaira Salazar-Chacón²,
José Luis Rojas-Martínez³, Henry Borbón⁴

Fecha de recepción: 16 de febrero de 2018

Fecha de aprobación: 23 de mayo de 2018

Rojas-Arrieta, K; Salazar-Chacón, Y; Rojas-Martínez, J; Borbón, H. Validación de una técnica para la determinación de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos de Costa Rica mediante cromatografía líquida acoplada a reactor post columna con detector de fluorescencia. *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-4. Octubre-Diciembre 2018. Pág 142-156.

DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3973>

1 Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Servicio Nacional de Salud Animal (LANASEVE-SENASA). Costa Rica. Correo electrónico: krojar2@yahoo.com

2 Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Servicio Nacional de Salud Animal (LANASEVE-SENASA). Costa Rica.

3 Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Servicio Nacional de Salud Animal (LANASEVE-SENASA). Costa Rica.

4 Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Tecnología Química, Escuela de Química, Universidad Nacional. Costa Rica. Correo electrónico: henry.borbon.alpizar@una.cr



Palabras clave

Toxinas paralizantes (PSP); bivalvos; cromatografía líquida-detector fluorescencia (HPLC-LF); reactor post-columna.

Resumen

Se implementaron las condiciones cromatográficas y de extracción para la validación de una técnica para la determinación de doce toxinas paralizantes (PSP), incluyendo los grupos STX's (saxitoxinas), GTX's (gonyautoxinas) y C's (*N*-sulfocarbamoil gonyautoxinas) para moluscos bivalvos. Para la metodología de extracción se evaluó y modificó la propuesta de Rourke *et al.* [1], utilizando una extracción ácida en HCl 0,1 M y ácido tricloroacético 30 m/v en la etapa de purificación. Posteriormente se evaluaron y modificaron los métodos cromatográficos propuestos por Rourke *et al.* [1] y Franco y Fernández [2]. La validación se realizó para el primer método citado [1], en el cual se establece un programa en gradiente para la separación de las toxinas STX's y GTX's, y un método isocrático para la separación de C's. La validación del método determinó un coeficiente de correlación (*R*) 0.995-1.000, un coeficiente de determinación (*R*²) 0.989-1.000 y un rango lineal de 53.7-926.6 µg STX diHCl equivalentes/100 g. La sensibilidad se determinó en 4.32-60.32 LU (µmol/L)⁻¹, el porcentaje de recuperación entre 58-115%, el coeficiente de variación entre 2-17% para la repetibilidad instrumental y 2-16% para repetibilidad metodológica. La sensibilidad (límites de detección (LODs)): 1.1-8.5 µg/100g; límites de cuantificación (LOQs)): 1.60-12.6 µg/100g. La aplicación de esta metodología demostró un buen desempeño y capacidad para la determinación simultánea de toxinas PSP en moluscos bivalvos.

Keywords

Paralytic shellfish poisoning (PSP); bivalves; high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-LF); post column reactor.

Abstract

Chromatographic and extraction conditions were implemented and validated for the determination of twelve paralytic toxins (PSP) in bivalves, including STX's (saxitoxins), GTX's (gonyautoxins) and C's (*N*-sulfocarbamoyl gonyautoxins). The extraction method of Rourke *et al.* [1] was tested and modified using an acid extraction in 0.1 M HCl and 30 m/v trichloroacetic acid in the purification step. The chromatographic methods proposed by Rourke *et al.* [1] and Franco and Fernández [2] were evaluated. The validation was performed for the first method mentioned [1]; a gradient program is established for the separation of STX's and GTX's toxins, and an isocratic method for the separation of C's. The established method was further validated by determining the correlation coefficient (*R*) (0.995-1.000), coefficient of determination (*R*²) (0.989-1.000), linear range (53.7-926.6 µg STX diHCl equivalents/100 g), sensitivity (4.32-60.32 LU (µmol/L)⁻¹), recovery percentage (58-115%), coefficient of variation (2-17%) for instrumental repeatability and (2-16%) for methodological repeatability, sensitivity (limits of detection (LODs)): 1.1-8.5 µg/100g and limits of quantification (LOQs)): 1.60-12.6 µg/100g. The application of this method proved good performance and capability for simultaneous determination of PSP toxins in bivalve molluscs.

Introducción

Las toxinas paralizantes (PSP: Paralytic Shellfish Poisoning) son producidas a partir de los dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* [3]-[5]. Estos organismos son consumidos por los moluscos bivalvos como parte de su dieta natural. Si el dinoflagelado contiene las toxinas, estas son acumuladas activamente por los moluscos concentrándose en su hepatopáncreas [6]. Las toxinas PSP se pueden clasificar por su estructura en tres subgrupos; el grupo *N*-sulfocarbamoil: B1, B2, C1, C2, C3, C4; el grupo decarbamoil: dcSTX, dcNeo, dcGTX1, dcGTX2, dcGTX3 y dcGTX4 y el grupo carbamoil: STX, Neo, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 [4]-[7]. Estas toxinas afectan el sistema nervioso central ya que se unen reversiblemente con alta afinidad a los sitios de unión en el canal de sodio; de esta manera bloquean el paso de los iones de sodio hacia el interior de la célula, inhibiendo el desarrollo del potencial de acción y la generación del impulso nervioso, provocando parálisis cardiorrespiratoria que puede llevar a la muerte del individuo [8]-[10].

En Costa Rica la obtención de los moluscos bivalvos se lleva a cabo por medio de dos metodologías: ostricultura o cultivo de ostras y extracción del producto del medio natural. En la actualidad, el cultivo de moluscos bivalvos se desarrolla activamente en el Golfo de Nicoya, donde existen cuatro granjas ostrícolas que producen la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) [11] para consumo local, con expectativas de exportar a corto plazo. La extracción es una práctica que se ha realizado a lo largo del litoral Pacífico costarricense, donde se puede mencionar especies de interés como la piangua (*Anadara tuberculosa*), la almeja arenera (*Chione fluctifraga*), la concha perla u ostra perlera (*Pteria sterna*); la barba de hacha o concha abanico (*Pinna rugosa*) y el ostión vaca (*Spondylus calcifer*) [11].

En el 2000, se presentó en Costa Rica un evento importante de Floraciones Algales Nocivas (FANs), para el cual se registraron 77 casos de intoxicación en humanos y la muerte de animales (cerdos y perros) por el consumo de moluscos bivalvos contaminados con toxinas PSP generadas por dinoflagelados. Por lo anterior, en el 2001, se publicaron los Decretos Ejecutivos 29328-MAG-S y N° 39669-MAG-S, donde se crea la Comisión Interinstitucional para la Prevención y Control de la Marea Roja en Costa Rica [11] y dicha Comisión se convierte en una comisión asesora del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASAVE), perteneciente al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), quien decretará las vedas y tomará las acciones sanitarias correspondientes en materia de marea roja tóxica [12]. A causa de este evento registrado en el 2000, se estableció una prohibición total a la extracción y comercialización de moluscos bivalvos mediante el Decreto Ejecutivo N° 29184-S-MAG³⁷. La concha perla, la concha abanico y el ostión vaca permanecen vedados desde entonces.

El LANASEVE es el ente que realiza desde el 2000 la determinación de las toxinas PSP en los moluscos bivalvos, como parte del monitoreo nacional organizado por el SENASA, el Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPESCA) y la Universidad Nacional (UNA). La determinación se lleva a cabo por medio del método de bioensayo en ratón, de acuerdo con el método AOAC 959.08 [13], el cual es reconocido por la Comisión de Regulación de la Unión Europea en su reglamento (CE) N° 2074/2005 como método de referencia para la determinación de las toxinas paralizantes (PSP) [4], [14]; y por el Codex Alimentarius como método para control de rutina [15]. No obstante para lo anterior, la Unión Europea en el mismo reglamento, indica que las pruebas biológicas deben ser reemplazadas tan pronto sea posible, por un método validado internacionalmente [4].

La principal desventaja del método de bioensayo en ratón es que no expresan de forma separada la concentración de cada análogo de la saxitoxina, reportando todo en términos de saxitoxina total, por lo que no es posible identificar el tipo de toxina presente. Para el LANASEVE surge la necesidad de implementar una metodología analítica por medio de la cual se obtenga

el perfil de toxinas para cada ítem de ensayo, y así cumplir con los requisitos establecidos por las normativas de referencia y el mercado internacional [16]-[18].

Por lo anterior, y en respuesta a las necesidades de la institución SENASA relacionadas con el compromiso país con las exigencias del mercado internacional, propone el objetivo de llevar a cabo la validación de una técnica para la determinación de las toxinas PSP en moluscos bivalvos mediante cromatografía líquida acoplada a reactor post-columna con detector de fluorescencia. Los beneficios esperados para la institución son la implementación del ensayo en las diferentes matrices, así como el establecimiento de tendencias que permitan la toma de acciones sanitarias para la protección de la salud pública.

Materiales y métodos

Las toxinas paralizantes evaluadas fueron las disponibles en el periodo de estudio como materiales de referencia del National Research Council of Canada, único proveedor a nivel mundial, a saber; STX, dcSTX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2.

Método de extracción

Para la extracción de las toxinas PSP se evaluó la metodología descrita por Rourke *et al.* [1], quienes utilizaron el ácido tricloroacético al 30% (m/v) en una etapa de purificación para la eliminación de las proteínas.

Para evaluar el desempeño de la metodología se inocularon muestras de ostra japonesa con PSP a un nivel de concentración intermedio de la curva de calibración de cada toxina. Se utilizó el valor medio del porcentaje de recuperación obtenido, como criterio de evaluación de la veracidad y se comparó con los criterios de aceptación definidos por Codex Alimentarius STAN 292 [19].

De las muestras de moluscos bivalvos se midió una masa de 100 g de músculo homogenizado, a los cuales se les agregó 100 mL de HCl 0,1 mol/L. Se verificó que el pH se encontrara entre 2 y 4, para posteriormente calentar el homogenizado hasta ebullición por 5 min, dejando luego enfriar a temperatura ambiente. El volumen total se ajustó a 200 mL con HCl 0,1 mol/L, se centrifugó por 10 min a 4000 s^{-1} ; del sobrenadante obtenido se colocaron 500 μL en un tubo de centrifuga de 2 mL, se agregaron 25 μL de ácido tricloroacético al 30% m/v, mezclando el contenido del tubo utilizando un vortex. Este se centrifugó a 4000 s^{-1} por 5 min, luego se agregaron 20 μL de NaOH 1,0 mol/L, se centrifugó a 4000 s^{-1} por 5 min, para finalmente filtrar el sobrenadante con un acrodisco de 0,22 μm . El filtrado se recolectó en un vial para automuestreador.

Método cromatográfico

Para la implementación del método cromatográfico se evaluaron y optimizaron las condiciones establecidas por Franco y Fernández [2], cuyo procedimiento consiste en realizar tres análisis cromatográficos para la determinación de los grupos de las toxinas, todos de modo isocrático.

En la separación de las toxinas NeoSTX, dcSTX, STX, se utilizó como fase móvil 95% de octanosulfonato de sodio 0,5 mmol/L, ácido fosfórico 10 mmol/L a pH 7,2 y 5% de acetonitrilo. La fase móvil utilizada en la separación de las toxinas GTXs y dcGTXs fue octanosulfonato de sodio 1,5 mmol/L, ácido fosfórico 10 mmol/L a pH 7,0. Las toxinas C1 y C2 se separaron con un 95% de fosfato de tetrabutilamonio 2,0 mmol/L a pH 6,5 y 5% de acetonitrilo.

En todos los casos, se realizó la derivatización postcolumna, empleando como reactivos derivatizantes una disolución de ácido peryódico 7 mmol/L, ácido fosfórico 50 mmol/L a pH 9 (reactor 1) y al ácido acético 0,5 mol/L (reactor 2) [2].

Se evaluó también la metodología planteada por Rourke *et al* [1], quienes establecen un programa en gradiente para la separación de las toxinas NeoSTX, dcSTX, STX, GTXs y dcGTXs, empleando como fase móvil: A: ácido heptanosulfónico 11 mmol/L, ácido fosfórico 5,5 mmol/L (pH 7,1); B: 88,5% ácido heptanosulfónico 11 mmol/L, ácido fosfórico 16,5 mmol/L, 11,5% acetonitrilo (pH 7,1). La separación de las toxinas C1 y C2 utilizó como fase móvil fosfato de tetrabutilamonio 2,0 mmol/L (pH 5,8) de modo isocrático. En ambos casos, se efectuó la derivatización postcolumna con los siguientes reactivos: ácido peryódico 5 mmol/L, ácido fosfórico 100 mmol/L (pH 7,8) (reactor 1) y ácido nítrico 0,75 mol/L (reactor 2).

Para la determinación de los grupos STXs y GTXs se utilizó una columna Zorbax Bonus - RP C14, 150 x 4.6 mm d.i., 3.5 µm de tamaño de partícula, con reactor post-columna (pickering), un flujo de fase móvil de 0.8 mL/min, un flujo de oxidante y ácido de 0.4 mL/min, temperatura del reactor de 85°C, temperatura del horno de columna de 40°C, un volumen de inyección de 20 µL para GTXs y STXs, el tiempo de corrida fue de 28 min. El gradiente se programó a 100% de Fase A los primeros 8 minutos, posteriormente 100% de Fase B del minuto 8 al minuto 16, y finalmente 100% Fase A del minuto 16 al minuto 28.

Las condiciones cromatográficas para la determinación de las toxinas Cs fueron una columna Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 x 4.6 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula, con reactor post-columna (pickering), un flujo de fase móvil de 0.8 mL/min, un flujo de oxidante y ácido de 0.4 mL/min, temperatura del reactor de 85°C, temperatura del horno de columna de 40°C, un volumen de inyección de 20 µL para Cs, el tiempo de corrida fue de 24 min.

Validación del método

Para evaluar las características de desempeño según lo establecido en la normativa vigente [19-20], se realizó la validación del método a partir de la determinación de los siguientes parámetros:

Linealidad y rango de trabajo

Se prepararon cuatro curvas de calibración para cada toxina, cada una con cinco disoluciones patrón. Los patrones se analizaron en el HPLC/FLD acoplado a reactor post columna, a partir de los datos de señal y concentración se graficaron las curvas de calibración; con el coeficiente de correlación y determinación se evaluó la linealidad. También se evaluó la similitud de las curvas preparadas para cada toxina mediante las pruebas de Tuckey y Fisher del análisis ANOVA, a un 95% de confianza. El rango de trabajo fue definido de acuerdo con la linealidad y el límite máximo permitido.

Sensibilidad

La sensibilidad de calibración se define como el cambio de la respuesta obtenida dividido por el correspondiente cambio de la concentración del analito; ésta se determinó como la pendiente de la ecuación de la curva de calibración promedio de cada toxina.

Veracidad

La veracidad se evaluó a través del porcentaje de recuperación. Se realizaron seis repeticiones a un nivel de concentración, para las toxinas STXs y GTXs, y dos repeticiones a un nivel de concentración para las toxinas Cs. Se tomó como base el rango lineal de trabajo de cada analito

para establecer el nivel de concentración, en todos los casos se empleó como matriz muestras de ostra japonesa.

Precisión

La repetibilidad instrumental se determinó analizando la dispersión de seis lecturas diferentes de un punto de la curva (el tercer patrón de la curva de calibración de cada toxina) y se expresó como coeficiente de variación.

La repetibilidad de la metodología se estableció mediante la evaluación de la dispersión de seis réplicas de una muestra de concentración conocida para el caso de las GTXs y STXs y dos réplicas para las toxinas Cs, analizadas bajo las mismas condiciones. Se tomó como base el rango lineal de trabajo de cada analito para establecer el nivel de concentración. En todos los casos se empleó como matriz muestras de ostra japonesa, se determinó la desviación estándar y se calculó el coeficiente de variación correspondiente.

Límite de detección

Se realizó la lectura independiente de 11 blancos matriz para el caso de STXs y GTXs y de 20 blancos matriz para las toxinas Cs. Se determinó el promedio de las señales obtenidas de los blancos matriz y se le sumó tres veces el valor de la desviación estándar obtenida del conjunto de datos, dicho valor se interpoló en la curva de calibración promedio, para obtener la mínima concentración detectable.

Límite de cuantificación

A partir de la lectura de los blancos matriz empleados para la determinación del límite de detección, se determinó el promedio de la señal del equipo obtenida y su desviación estándar. El valor obtenido de la suma del promedio más 10 veces la desviación estándar se interpoló en la curva de calibración promedio, para obtener la concentración mínima cuantificable. Se fortificaron tres muestras cerca del límite de cuantificación de cada toxina y se determinó el porcentaje de recuperación para verificar la veracidad del método en el límite de cuantificación.

Resultados y discusión

Rendimiento de recuperación del método de extracción

El cuadro 1 resume los valores medios de los porcentajes de recuperación obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar que describen el comportamiento de la precisión expresada. Los porcentajes de recuperación obtenidos para las toxinas del grupo STXs, GTXs y Cs, al aplicar el método de Rourke *et al.* [1], son aceptables según los criterios de veracidad establecidos por CODEX STAN 292-2008, donde se indica que porcentajes de recuperación entre 50 y 130% son aceptables para este tipo de matriz [19]. El ácido tricloroacético empleado en la etapa de extracción propuesta por Rourke *et al.* [1], permitió precipitar las proteínas presentes en la muestra y de esta manera eliminar cualquier interferencia que pudiera influir sobre las propiedades analíticas de los analitos reduciendo así el efecto matriz.

Condiciones cromatográficas

Se utilizaron dos referencias para el establecimiento de las condiciones cromatográficas para los distintos subgrupos de toxinas PSP. En las figuras de 1 a 6 se presentan los resultados de esta optimización.

Cuadro 1. Valores promedio de porcentajes de recuperación obtenidos de toxinas de los grupos STXs, GTXs y Cs.

	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
% Rec	84	114	111	66	81	90
Desv Est	4,8	3,2	3,4	10,2	5,7	3,3
	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
% Rec	77	96	102	115	72	58
Desv Est	6,3	3,0	2,7	4,6	3,2	0,9

En las figuras 1 y 2 se muestran los cromatogramas obtenidos al utilizar las dos metodologías propuestas para la separación de las STXs. Al aplicar lo establecido por Franco *et al.* [2] (figura 1), no se observa la separación de todas las STXs, lo que implica una posible coelución en dos picos cromatográficos. En la figura 2 se muestra la separación de las STXs al utilizar el método propuesto por Rourke *et al.* [1], donde se utiliza la fase móvil con gradiente. Con esta metodología, se logra la separación satisfactoria de las toxinas STXs.

Las figuras 3 y 4 muestran los cromatogramas obtenidos para las toxinas del grupo GTXs. Utilizando la metodología establecida por Franco *et al.* [2], como se observa en la figura 3, no se logra la separación adecuada de este grupo de toxinas. La dcGTX3 y la GTX5 se obtienen en el mismo pico cromatográfico, lo cual se puede explicar por la ausencia del acetonitrilo en la fase móvil. La figura 4 muestra el cromatograma obtenido al aplicar el método de Rourke *et al.* [1]; los compuestos se retienen en la columna por interacciones hidrofóbicas, en este caso, el acetonitrilo disminuye la polaridad de la fase móvil, el efecto hidrofóbico disminuye y se logra la elución de los compuestos.

Las figuras 5 y 6 muestran los cromatogramas obtenidos para las toxinas C1 y C2 al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Franco *et al.* [2] y Rourke *et al.* [1] respectivamente. En la figura 5 se observa como al aplicar el método propuesto por Franco *et al.* [2] no se obtiene una separación satisfactoria de las toxinas ensayadas, sin embargo, al eliminar el 5 % de fase orgánica y disminuir el pH a 5,8, según lo establece Rourke *et al.* [1] (figura 6), se logra la resolución adecuada de los picos, siendo, por tanto, el método aceptable para la separación de este grupo de toxinas.

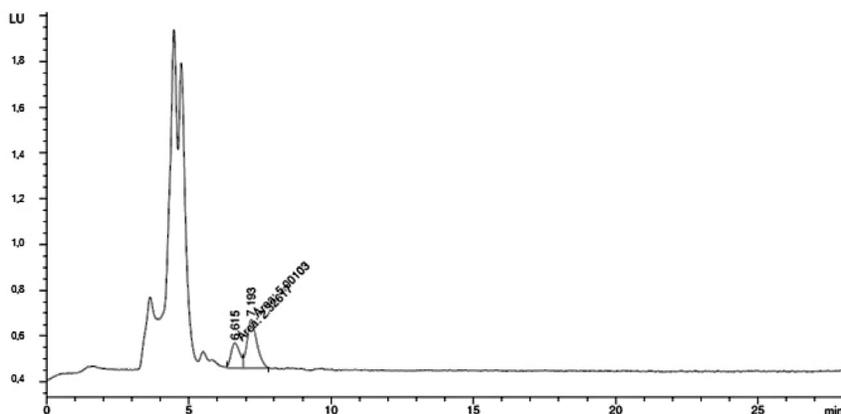


Figura 1. Cromatograma obtenido para las toxinas STXs al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Franco *et al.* [2].

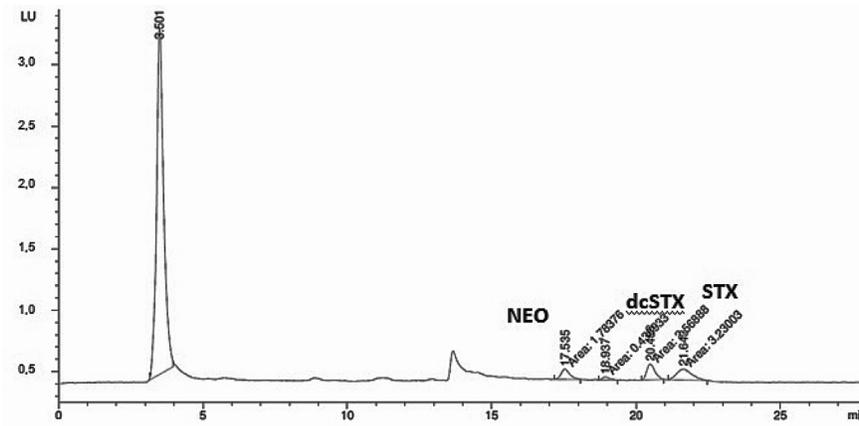


Figura 2. Cromatograma obtenido para las toxinas STXs al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Rourke *et al.* [1]. Orden de elución: NEO, dcSTX, STX.

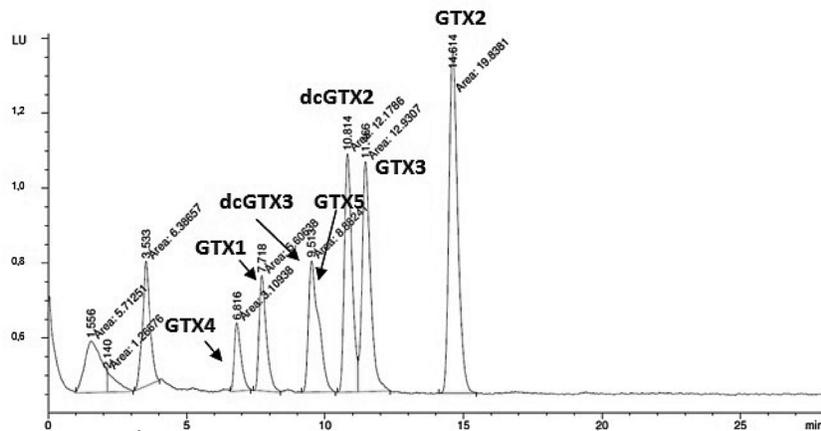


Figura 3. Cromatograma obtenido para las toxinas GTXs al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Franco *et al.* [2].

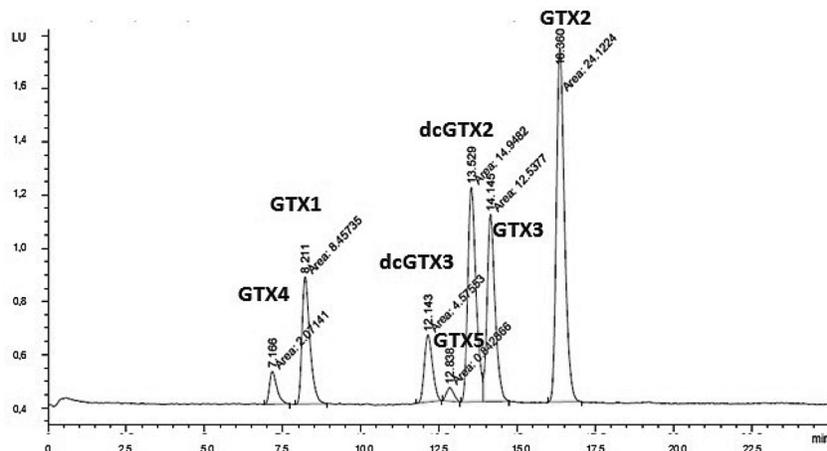


Figura 4. Cromatograma obtenido para las toxinas GTXs al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Rourke *et al.* [1]. Orden de elución: GTX4, GTX1, dcGTX3, GTX5, dcGTX2, GTX3, GTX2.

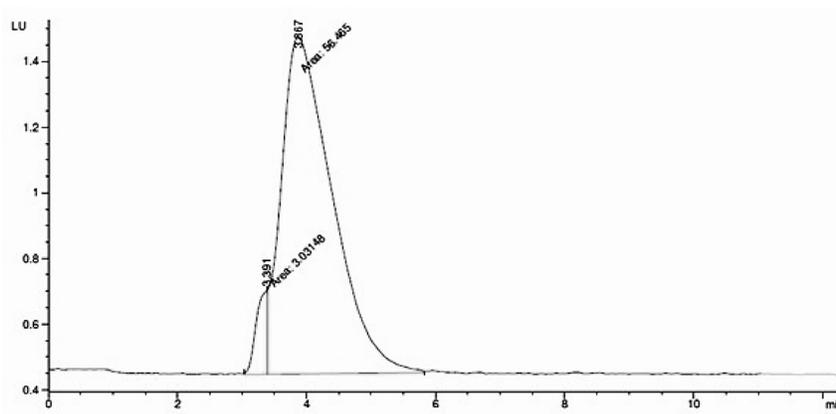


Figura 5. Cromatograma obtenido para las toxinas C1 y C2 al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Franco *et al.* [2].

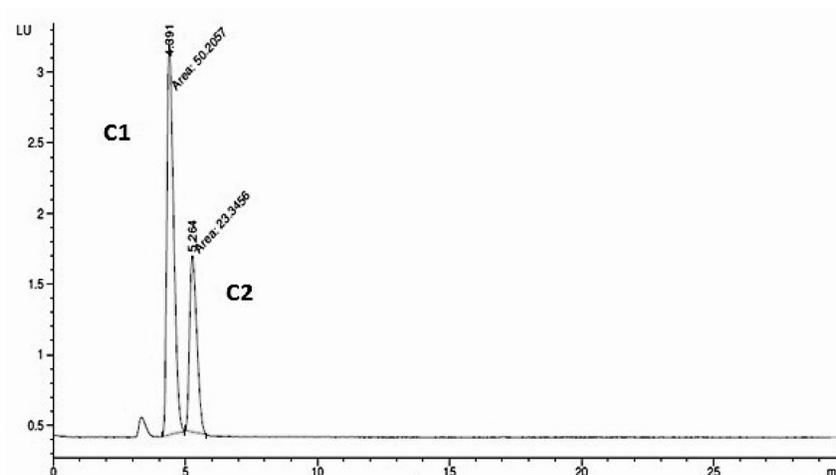


Figura 6. Cromatograma obtenido para las toxinas C1 y C2 al aplicar las condiciones cromatográficas establecidas por Rourke *et al.* [1]. Orden de elución: C1, C2.

Con los resultados obtenidos en los cromatogramas, se consideró la metodología de Rourke *et al.* [1] como la idónea para el análisis de todos los grupos de toxinas en las muestras objeto de estudio.

Validación del método

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la validación del método seleccionado, para el análisis de las toxinas evaluadas.

Linealidad y rango de trabajo

Se definió el rango de trabajo como el intervalo de las concentraciones en las que se aplicó el método. Se evaluó también la linealidad del método para cada toxina, es decir el rango de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición, en este caso el área del pico cromatográfico, es una función lineal de la concentración.

De acuerdo con las curvas de calibración se estableció el ámbito lineal para cada analito, tanto en disolución como en matriz, mismo que se indica en el cuadro 2.

Cuadro 2. Determinación del rango de trabajo del método empleado para la determinación de toxinas PSP.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4
Rango lineal (µmol/L)	(0,1181-2,3616)	(0,0585 - 1,1700)	(0,0597 - 1,1934)	(0,0831 - 1,3298)
Rango lineal (µg/100 g)	(8,1-162,2)	(4,2-84,0)	(4,8-96,8)	(7,4-119,3)
Parámetro	GTX1	dcGTX3	GTX5	dcGTX2
Rango lineal (µmol/L)	(0,2548 - 4,0770)	(0,0413 - 0,6615)	(0,1371 - 2,1932)	(0,1408 - 2,2523)
Rango lineal (µg/100 g)	(22,8-365,6)	(3,2 - 50,8)	(11,3-181,4)	(10,8-172,9)
Parámetro	GTX3	GTX2	C1	C2
Rango lineal (µmol/L)	(0,0610 - 0,9765)	(0,1606 - 2,5695)	(0,2041 - 4,0824)	(0,0610 - 1,2204)
Rango lineal (µg/100 g)	(5,3-84,2)	(13,8-221,5)	(21,2-423,1)	(6,3-126,4)

La similitud de las curvas de calibración preparadas para cada toxina, se evaluó mediante las pruebas de Tuckey y Fisher a un 95% de confianza. Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las curvas preparadas para un mismo analito, por lo que se graficó la curva promedio para cada uno. Para cada curva se determinó el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta de calibrado, tal como se observa en el cuadro 3. Para el caso específico de las toxinas Cs, la calibración fue externa (en disolución), mientras que para las GTXs y STXs, la calibración se realizó sobre matriz.

Cuadro 3. Evaluación de la linealidad del método empleado para la determinación de toxinas PSP.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
Coeficiente de correlación (R)	1,000	0,999	0,999	0,995	0,999	0,996
Coeficiente de determinación (R^2)	1,000	1,000	1,000	0,990	0,999	0,992
Parámetro	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
Coeficiente de correlación (R)	1,000	0,995	1,000	1,000	1,000	1,000
Coeficiente de determinación (R^2)	1,000	0,989	0,999	1,000	1,000	1,000

Según los datos mostrados en el cuadro 3, tanto el coeficiente de correlación, como el de determinación cumplen con los criterios establecidos por el procedimiento de aseguramiento de la calidad de la Unidad RECAA, según el cual $R \geq 0,99$ y $R^2 \geq 0,98$ [21].

El rango lineal del método para la determinación de las toxinas PSP, expresado como µg STX diHCl equivalentes/100 g, es de 53,7 – 926,6. El mismo se estableció a partir del primer y último punto de la curva de calibración de cada analito. El rango lineal se considera aceptable, ya que el límite máximo permitido de 80 µg STX diHCl equivalentes/100 g está contemplado en el mismo [19].

Sensibilidad

La sensibilidad de calibración se determinó con la pendiente de la ecuación de la curva de calibración promedio de cada analito, los valores obtenidos se indican en el cuadro 4.

Cuadro 4. Determinación de la sensibilidad del método empleado para la determinación de toxinas PSP.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
Sensibilidad LU*($\mu\text{mol/L}$) ⁻¹	5,0462	10,296	15,982	4,3205	5,925	29,187
Parámetro	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
Sensibilidad LU*($\mu\text{mol/L}$) ⁻¹	5,804	21,895	60,322	24,277	10,188	20,944

Según el cuadro 4, la toxina que presentó un valor de pendiente menor, y por tanto una mayor sensibilidad fue la GTX4, mientras que la GTX3 mostró una sensibilidad menor comparada con los otros analitos.

Exactitud

Para conocer la exactitud del método, se realizó la evaluación de la veracidad y de la precisión.

En el cuadro 5 se muestra el nivel de concentración al que se realizó la fortificación, el porcentaje de recuperación obtenido para cada toxina, así como el criterio de aceptación establecido en la normativa para evaluar la veracidad. La C2 presentó el porcentaje de recuperación más bajo de las toxinas evaluadas (58%), lo cual se puede atribuir a una extracción incompleta del analito de la matriz en estudio. La GTX2 mostró el porcentaje de recuperación más alto (115%), lo cual se justifica en términos de la distribución normal que pueden seguir los datos de la concentración del analito en la muestra.

Según los datos indicados, para todas las toxinas PSP se cumple con el criterio de aceptación para el porcentaje de recuperación, establecido según el CODEX STAN 292-2008 de (50 - 130)% [19]. Este rango de aceptación es el producto del consenso de expertos del CCMAS (Comité de Métodos de Análisis y Muestreo) del Codex Alimentarius, los cuales usan como base científica los datos de validación de los laboratorios de referencia de los países miembros.

Cuadro 5. Determinación de la veracidad del método empleado para la determinación de toxinas PSP.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
Nivel de Concentración ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	47,0	21,5	24,3	29,2	89,4	12,1
Porcentaje de Recuperación	84	114	111	66	81	90
Parámetro	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
Nivel de Concentración ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	44,5	41,2	20,1	52,8	84,7	25,4
Porcentaje de Recuperación	77	96	102	115	72	58

Los valores obtenidos en la evaluación de la precisión del método se pueden observar en el cuadro 6.

En todos los casos, se cumple el criterio de aceptación para los analitos, debido a que los valores de CV (%) obtenidos en las pruebas de repetibilidad son inferiores a los establecidos por CODEX STAN 292-2008 (44% para Neo, dcSTX, STX, GTX4 y GTX1 y 38% para dcGTX3, GTX5, dcGTX2, GTX3, GTX2, C1 y C2) [19]. La evaluación de la repetibilidad instrumental y de la metodología, indica que el método para la determinación de toxinas PSP por cromatografía líquida es preciso.

Cuadro 6. Evaluación de la precisión del método empleado para la determinación de toxinas PSP.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
CV (%) Repetibilidad Instrumental	3	2	2	17	6	17
CV (%) Repetibilidad de la metodología	6	3	3	16	7	4
Parámetro	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
CV (%) Repetibilidad Instrumental	15	13	16	5	1	1
CV (%) Repetibilidad de la metodología	8	3	3	3	4	2

Límites de detección y cuantificación

En el cuadro 7 se muestran los valores obtenidos para los límites de detección y de cuantificación calculados, utilizando la metodología IUPAC [22].

Cuadro 7. Determinación de los límites de detección y cuantificación del método empleado para la determinación de toxinas PSP.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
Límite de detección (µg/100 g)	1,3	2,1	2,5	7,0	1,4	1,1
Límite de cuantificación (µg/100 g)	5,2	5,0	6,1	9,4	4,6	1,6
Parámetro	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
Límite de detección (µg/100 g)	8,5	1,2	2,1	7,4	2,8	1,8
Límite de cuantificación (µg/100 g)	12,1	1,8	2,4	12,6	3,9	3,9

Con los datos obtenidos en el cuadro 8 se define una concentración de STX menor o igual a 2,5 µg/100 g como “No detectado”. Concentraciones mayores a 2,5 µg/100 g y menores a 6,1 µg/100 g se reportan como “No cuantificable”.

Al evaluar la veracidad en los niveles del límite de detección y cuantificación, se obtuvieron los valores de porcentaje de recuperación detallados en el cuadro 8.

Cuadro 8. Evaluación de la veracidad en el límite de cuantificación.

Parámetro	Neo	dcSTX	STX	GTX4	GTX1	dcGTX3
Concentración cercana al límite de detección (µg/100 g)	1,8	2,1	2,8	2,3	7,1	1,1
Concentración cercana al límite de cuantificación (µg/100 g)	5,6	5,0	6,3	4,6	14,0	1,6
Porcentaje de Recuperación en el LC	95	132	74	121	76	174
Parámetro	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	C1	C2
Concentración cercana al límite de detección (µg/100 g)	8,5	3,9	2,86	7,52	6,06	1,81
Concentración cercana al límite de cuantificación (µg/100 g)	12,1	5,4	4,8	12,6	13,3	4,0
Porcentaje de Recuperación en el LC	112	131	118	103	72	82

Según el cuadro 8, la evaluación del límite de detección permitió comprobar que en todos los casos, se logra identificar el analito en cuestión. Al evaluar la veracidad en el límite de cuantificación, se presentaron porcentajes de recuperación que incumplen los criterios de veracidad de 50% a 130%, establecidos en la normativa CODEX STAN 292-2008 [19], por ejemplo: 132% para la dcSTX, 174% para la dcGTX3 y 131% para la dcGTX2. Por lo anterior se recomienda que estos sean reevaluados cuando el método se establezca como rutina en el laboratorio. No obstante, la contribución de todos los límites de cuantificación, al igual que los de detección, se emplearon para establecer los parámetros de desempeño del método.

El límite de detección y límite de cuantificación expresados como µg STX diHCl equivalentes/100 g se determinó en 19,8 y 40,7 respectivamente. Estos valores se consideran aceptables, ya que según el Codex Alimentarius (CX/RVDF 03/10) [23] para las sustancias que tienen límite máximo de residuos (LMR), el límite de cuantificación (LC) debe ser al menos la mitad del LMR. En este caso el límite máximo es de 80 µg STX diHCl equivalentes /100 g de carne de molusco [19]. La evidencia obtenida en la determinación de los parámetros de desempeño, permitió concluir que el método para la determinación de toxinas paralizantes por HPLC/FLD con oxidación post columna, cumple los parámetros de validación requeridos para su aplicación.

Conclusiones

Se logró la separación, identificación y cuantificación de las toxinas PSP al emplear el método cromatográfico establecido por Rourke *et al.* [1]. El método de extracción de las toxinas PSP

en moluscos bivalvos aplicado en este estudio permitió cumplir con los criterios de sensibilidad y exactitud indicados en la normativa vigente. La evidencia obtenida en la evaluación de los parámetros de desempeño: linealidad, ámbito de trabajo, sensibilidad, especificidad, selectividad, exactitud (veracidad y precisión), límites de detección y límite de cuantificación, permitieron concluir que el método para la determinación de toxinas paralizantes por HPLC/FLD con oxidación post columna, es apto para su aplicación. El contar con un método analítico cuantitativo para la determinación de toxinas PSP, permitirá al SENASA (institución responsable de velar por la inocuidad de los alimentos de origen animal), específicamente en la dirección del LANASEVE (laboratorio oficial encargado de ejecutar los análisis de los contaminantes presentes en los alimentos), obtener resultados cuantitativos confiables, los cuales se pueden comparar con la normativa de referencia internacional: Codex Alimentarius y Unión Europea.

Agradecimientos

Al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) y al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) por todo el soporte instrumental. Al Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPECA) por la cooperación en el muestreo y envío del material para la elaboración del presente trabajo.

Referencias

- [1] W. A. Rourke *et al.*, "Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue", *J AOAC Int*, vol. 9, n° 3, pp. 589-597, 2008.
- [2] J. M. Franco & P. Fernández-Vila, "Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography, with postcolumn reaction and fluorimetric detection", *Chromatographia*, vol. 35, n° 9-12, pp. 613-620, 1993.
- [3] J. F. Lawrence *et al.*, "Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning", *J AOAC Int*, vol. 88, n° 6, pp. 1714-1732, 2001.
- [4] M. J. Boundy *et al.*, "Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction", *J Chromatogr A*, vol. 1387, pp. 1-12, 2015.
- [5] R. A. Neves *et al.*, "Immunological and physiological responses of the periwinkle *Littorina littorea* during and after exposure to the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*", *Aquat Toxicol*, vol. 160, pp. 96-105, 2015.
- [6] J. F. Lawrence *et al.*, "Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs: Fisheries and Aquaculture Technical Paper 551". Edited by Food and Agriculture Organization (FAO). pp. 4-6, 2011.
- [7] J. van de Riet *et al.*, "Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: Collaborative study", *J AOAC Int*, vol. 94, n° 4, pp. 1154-1176, 2011.
- [8] H. Hégaret *et al.*, "Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*", *Harmful Algae*, vol. 18, pp. 74-83, 2012.
- [9] J. F. Howard & D. B. Sanders, "Neurotoxicology of neuromuscular transmission" *Handb Clin Neurol*, vol. 91, pp. 369-400, 2008.
- [10] J. Hsiao-Chin *et al.*, "Tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in gastropod species from Vietnam analyzed by high- performance liquid chromatography and liquid chromatography e tandem mass spectrometry", *J Food Drug Anal*, vol. 22, n° 2, pp. 178-188, 2013.
- [11] E. Calvo & N. Lara, "Fitoplancton nocivo y floraciones algales en el Golfo de Nicoya durante el período de mayo a agosto del 2014". Observatorio ambiental-UNA. http://www.una.ac.cr/observatorio_ambiental/ (accesado el 30 de marzo, 2016).
- [12] Ministerios de Agricultura y Ganadería, Ministerios de Salud. N° 39669-MAG-S. Establecimiento de la comisión para la vigilancia epidemiológica de la marea roja. 2017.



- [13] AOAC, "Official method 959.08. Paralytic shellfish poison, biological method". In: Horwitz, W. Ed. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. *AOAC International*, Gaithersburg, MD, 59–61, 2000.
- [14] B. Ben-Gigirey *et al.*, "A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish", *Toxicon*, vol. 60, n° 5, pp. 864-873, 2012.
- [15] Codex Alimentarius. Propuesta posición del subcomité CCMAS de Chile 09.01.2014 CX/MAS 15/36/2 cuestiones remitidas al comité por la comisión del Codex Alimentarius y otros órganos auxiliares. Métodos para la determinación de Biotoxinas Marinas. 2014.
- [16] S. Burrell *et al.*, "Proficiency of laboratories for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by QUASIMEME: A review", *Trend Anal Chem*, vol. 75, pp. 10-23, 2016.
- [17] P. R. Costa *et al.*, "Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska", *Toxicon*, vol 54, n° 3, pp. 313-320, 2009.
- [18] J. F. Lawrence *et al.*, "Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study", *J AOAC Int*, vol 88, n° 6, pp. 1714-1732, 2005.
- [19] Codex Alimentarius. STAN 292-2008. Standard for live and raw bivalve molluscs. 2008.
- [20] Codex Alimentarius. CX/FFP 14/33/5 Draft performance criteria for reference and confirmatory methods for marine biotoxins (section i-8.6 determination of biotoxins) in the standard for live and raw bivalve molluscs. 2014.
- [21] LANASEVE-SENASA. Aseguramiento de la calidad IA-RECAA-PE-004, versión 07. 2015.
- [22] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). "Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including detection a quantification capabilities –IUPAC recommendations 1995", *Pure & Appl Chem*, vol 67, n°10, pp. 1699-1723, 1995.
- [23] Criterios de aceptación de resultados: Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del CODEX sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos CX/RVDF 03/10. Décimo cuarta Sesión 4-7 marzo de 2003.