

CUANTIFICACION DE ACIDO DOMOICO EN MOLUSCOS BIVALVOS DE LAS COSTAS CHILENAS Y SU RELACION CON EL NIVEL INTERNACIONALMENTE ACEPTADO.

ESTEBAN HERNANDEZ R.¹, JAVIER ILABACA S.¹, IRENE MONTOYA C.¹, AMERICO LOPEZ R.²

ESTIMATION OF DOMOIC ACID IN BIVALVE MOLLUSKS IN CHILEAN COASTS AND THEIR RELATION WITH THE INTERNATIONAL LEVEL ACCEPTED.

Background. Red tides along Chilean coast have shown an important impact in public health and represent a permanent danger to the national fishery industry. This occurs because there has been potentially toxic biotoxin detected, called domoic acid, also known as seafood amnesic venom. There has been an international limit level established in concentrations of 20 µg/g of seafood. This is why we have considered it important to determine if domoic acid levels in Chilean seafood are following the international standards.

Methods. Domoic acid levels detected were analyzed through HPLC/UV, newly implemented in our lab.

Results. From all the positive samples (822), 746 (90.8%) have domoic acid concentrations lower than 20 µg/g and 76 (9.2%) were higher than 20µg/g.

Conclusions. These results show that approximately 10% of all the samples analyzed have levels higher than the international level accepted, revealing that there is a need to constantly monitor chilean coast seafood, since in our country the presence of domoic acid involves a high risk in public health and in the economy.

Key Words: Red tide, domoic acid, biotoxin.

INTRODUCCION

Los estallidos de marea roja a lo largo de las costas chilenas han significado un importante impacto en la salud pública y son una constante amenaza para la industria pesquera nacional. Esto se debe a que en ellos se ha detectado la presencia de diversas biotoxinas de origen marino (1,2,3).

Las mareas rojas o florecimientos algales nocivos se producen por un aumento de la población total de algún tipo de microalga, debido a diferentes factores oceánicos como temperatura, luminosidad, salinidad y corrientes, así como factores asociados a la actividad humana como es la contaminación ambiental (4,5).

La biotoxina veneno amnésico de marisco (VAM) o ácido domoico es producida por la microalga *Pseudonitzschia spp.* Es un compuesto natural, hidrosoluble y termoestable, que pertenece al grupo de aminoácidos llamado kainoides, clasificados como neuroexcitantes que interfieren con los mecanismos de neurotransmisión cerebral por actuar como poderosos agonistas de receptores glutamatérgicos en el sistema nervioso central (6,7).

VAM fue originalmente aislado desde la macroalga roja *Chondria armata* por investigadores japoneses en el año 1958. El

primer antecedente sobre intoxicación masiva por VAM ocurrió en la costa este de Canadá en 1987, debido al consumo de mariscos contaminados, dando como resultado 4 muertes y más de 100 ingresos en el Hospital con diagnóstico de intoxicación aguda, de los cuales 14 casos presentaron daño neurológico severo. Durante el incidente se estimó que los mariscos contaminados contenían VAM en un rango de concentración de 300 a 1000 µg/g de tejido de marisco. Desde entonces el límite regulatorio del VAM en Canadá se fijó en 20 µg/g de tejido de marisco, valor que es aceptado internacionalmente (8).

En Chile, las primeras evidencias de VAM fueron detectadas en junio de 1997 por A. López y col., con concentraciones bajo el nivel aceptado internacionalmente.

Clínicamente, se define como intoxicación por VAM a la ocurrencia de uno o más síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, cólicos abdominales) dentro de las 24 horas posteriores a la ingesta de mariscos, o bien al menos uno de los siguientes síntomas neurológicos a las 48 horas de la ingesta: confusión, pérdida de memoria, desorientación u otros signos graves como convulsiones o coma (9).

¹ Estudiante 5º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ² Subdirector Laboratorio de Toxinas Marinas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El objetivo de esta investigación es la detección de VAM en las costas de Chile durante el año 2000, y su correlación con los límites fijados internacionalmente.

MATERIAL Y METODO

Se determinó la presencia de VAM en extractos de mariscos mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, la cual entrega gráficamente las concentraciones de VAM presentes en las muestras.

Se analizaron 3288 muestras de diversos recursos marinos. Todas las muestras analizadas fueron obtenidas a través del Programa de Sanitización de Moluscos Bivalvos de SERNAPESCA-CEE.

Se empleó un cromatógrafo líquido de alto rendimiento Thermo Separation, equipado con una bomba SpectraSYSTEM P1000, Auto Sampler AS 3000 con control de temperatura, detector SpectraSYSTEM UV1000 de longitud de onda variable; procesador e integrador Cromojet, desgasificador Thermo Separation Membrane Degasser e inyector Rheodyne modelo 7125. Entre los equipos accesorios se utilizaron un baño de ultrasonido Branson 2200, centrífuga refrigerada Sorval y balanza analítica Mettler. mini-columnas SAX-SPE, 3 mL, 500 mg (J.T. Baker Scientific).

Preparación de la muestra: Las muestras se prepararon y se sometieron a un proceso de extracción de acuerdo al procedimiento descrito en Wright & Quilliam, Manual IOC (1995). Se mezcló una parte de tejidos de mariscos con 4 partes de metanol/H₂O (10 g. de muestra en 40 mL metanol/ agua (1:1)). La mezcla fue homogeneizada y luego fue centrifugada por 10 min. a 5.000 rpm (centrífuga refrigerada). El sobrenadante fue filtrado a través de filtro Smith de 0.45 µm. Las muestras fueron analizadas dentro de 24 horas con posterioridad a su extracción. Se almacenaron a -20° C (en caso de necesidad).

Curva de Calibración Estándar: Se estableció el rango lineal de la medición de ácido domoico mediante curvas de calibración. Se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones de ácido domoico: 0.2 - 0.5 - 1.0 - 2.5 - 5.0 - 10.0 µg/mL. Para excluir interferencias por triptofano, que en algunos recursos (chorito, almeja y erizo) muestra un pico detectable en las cercanías del

tiempo de retención del ácido domoico, se inyectó una mezcla de ácido domoico y triptofano (0.5 y 5 µg/mL respectivamente) para verificar la resolución de los picos de ambos compuestos. Los extractos de las muestras se inyectaron en duplicados. El loop del inyector se lavó entre cada inyección con solución de dilución para evitar la contaminación con residuos de muestras anteriores. Las áreas de los picos de cada muestra fueron promediadas. Al comienzo y entre las determinaciones, se repitió la inyección de la solución de calibración de ácido domoico de 5.0 µg/mL.

El método estadístico utilizado fue la prueba de Chi cuadrado.

RESULTADOS

1.- En relación con la metodología usada para determinar el ácido domoico, no se observaron interferencias en el tiempo de retención establecido para VAM en ninguna de las muestras analizadas.

2.- Al agregar suplementariamente solución estándar de ácido domoico a las muestras, se observó un incremento del área del pico en proporción a la concentración de estándar añadida.

3.- Las muestras analizadas evidenciaron pico cromatográfico en el tiempo de retención fijado para la identificación de VAM.

4.- Se analizaron un total de 3288 muestras, obteniéndose 822 muestras positivas para VAM que corresponden a un 25% del total, con un 9.2% de muestras por sobre la norma internacional. El detalle de las concentraciones encontradas en las muestras positivas se expresa en la Tabla 1.

Tabla 1. Intervalos de concentración de VAM.

Intervalo de Concentración	Muestras Positivas (Número)	Porcentaje (%)
Menor a 3 ug/g	539	65,6
Entre 3 y 10 ug/g	167	20,3
Entre 10 y 20 ug/g	40	4,9
Mayor a 20 ug/g	76	9,2
Total	822	100

DISCUSION

Sobre la base de los antecedentes y resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que de las 3288 muestras de moluscos bivalvos analizadas, 822 (25%) presentan toxicidad por veneno amnésico de mariscos. De ellas, 76 (9.2%) sobrepasan el límite de 20 $\mu\text{g/g}$ establecido internacionalmente y 3 de ellas presentan una concentración de toxina al nivel observado durante la intoxicación masiva con fatales consecuencias ocurrida en 1987 en Canadá (332-318-297 $\mu\text{g/g}$ respectivamente).

La presencia del VAM en las costas de Chile en estas concentraciones representa un gran peligro para la salud de la población debido al gran consumo de mariscos tanto dentro como fuera del país y nos muestra la deficiencia existente respecto a la detección y control del VAM en nuestros recursos marinos. Es también de gran importancia el efecto que estos hallazgos suponen para la industria pesquera nacional, que podría verse seriamente afectada en su actividad, tanto en el país como internacionalmente.

Este hallazgo, si bien es cierto cubre un corto periodo de tiempo, debido al rango de concentración de toxina detectada justifica plenamente la necesidad de incluir sin interrupción la medición de veneno amnésico en bivalvos y en otros recursos marinos. Estos resultados y las experiencias de otros países, nos permiten deducir que en aquellas épocas de mayor incidencia de la presencia del género potencialmente tóxico *Pseudonitzcha spp.* asociado al veneno amnésico de mariscos, existe una gran incidencia de contaminación de los recursos bentónicos de nuestro litoral.

En la actualidad se desconoce gran parte de las consecuencias de la intoxicación subclínica sobre el hombre o la existencia de un carácter acumulativo de sus efectos. Este hecho nos lleva a plantear la urgente necesidad de seguir caminos más amplios de investigación sobre esta toxina recientemente detectada en las costas de nuestro país.

Por otro lado, como estudiantes de Medicina, nos es imposible abstraernos de la situación de salud de nuestro país y es por eso que nos preocupa la falta de preparación del equipo médico frente a episodios de intoxicación por esta toxina, que representa un grave problema de salud pública en sí, cuyas sintomatologías pueden inducir a error en su diagnóstico y tratamiento, producto de su semejanza con otras patologías. Todo esto hace imprescindible el implementar

como desafío a escala nacional, la capacitación del personal de la salud en lo que a este tema respecta y la ejecución de planes de control estrictos en la comercialización de mariscos mediante el desarrollo de métodos rápidos de detección de esta toxina.

RESUMEN

Antecedentes. Los estallidos de marea roja a lo largo de las costas chilenas han mostrado un importante impacto en la salud pública y son un constante peligro para la industria pesquera nacional. Esto debido a que en ellos se ha detectado la presencia de la biotoxina de origen marino potencialmente tóxica ácido domoico, también denominado veneno amnésico de mariscos (VAM). Internacionalmente se ha establecido como límite regulatorio para el ácido domoico 20 $\mu\text{g/g}$ de marisco. Es por esto, que hemos considerado importante el determinar si las detecciones de ácido domoico en nuestro país se encuentran dentro de los límites fijados internacionalmente.

Métodos. La determinación analítica del ácido domoico fue realizada por HPLC/UV, implementada en nuestro laboratorio.

Resultados. Los resultados obtenidos son: del total de muestras positivas (822), 746 (90,8%) tienen concentraciones de ácido domoico menor a 20 $\mu\text{g/g}$, y 76 (9,2%) tienen concentraciones mayores de 20 $\mu\text{g/g}$.

Conclusiones. Estos resultados revelan que cerca del 10% de las muestras analizadas poseen niveles claramente superiores al límite regulatorio establecido internacionalmente, poniéndose de manifiesto la necesidad de monitorizar constantemente las costas chilenas, puesto que en nuestro país la presencia de ácido domoico constituye un alto riesgo para la salud pública y economía de nuestro país.

Palabras Clave: Marea roja, ácido domoico, biotoxina.

BIBLIOGRAFIA

1. CORTES R. Mareas Rojas. AGT Editor S.A., 1998; 43-75; 81-105.
2. SUAREZ B, GUZMAN L. Mareas Rojas y Toxinas Marinas. Editorial Universitaria, 1999; 44-45; 47: 50-53.

3. PALMA S, KAISER K. Plancton Marino de Aguas Chilenas. Ediciones Universitarias de Valparaíso, 1993.
4. YASUMOTO T, MURATS M. Marine Toxins. Chemical Reviews 1993; 93: 1897-1909.
5. UNESCO. Manual on Harmful Marine Microalgae, Intergovernmental Oceanographic Commission, 1995: 213-228.
6. DICKEY R, FRYXELL G, GRANADE H, ROELKE D. Detection of the Marine Toxins, Okadaic Acid and Domoic Acid in Shellfish and Phytoplankton in the Gulf of Mexico. Toxicon 1992; 30: 355-359.
7. GARRISON D, CONRAD S, EILERS P, WALDOM E. Confirmation of Domoic Acid Production by Pseudonitzschia Australis Culture. J Phycol 1992; 28: 604-607.
8. BIALOJAN C, TAKAI A. Canadian Shellfish Sanitation Programme (CSSP). Federal Department of Fisheries and Oceans 1998; 253-283.
9. OSORIO C. Moluscos Marinos de Importancia Económica en Chile. Editorial Cespe, 1979; 21-35.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Sr. Américo López R., por su dedicada orientación, tiempo y comprensión, a la Srta. Luz Silva, Sr. Hugo Loyola y Sr. John S. Ramsdell, por su consejo e inspiración.

Correspondencia:
Esteban Hernández R.
esghera@yahoo.com