



Universidad Veracruzana

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS AGROPECUARIAS**

ZONA: Poza Rica -Tuxpan

Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros

Título

“Evaluación de biotoxinas marinas en *Crassostrea virginica* en la laguna de Tampamachoco y la laguna Tamiahua, Veracruz”

TESIS

Que para obtener el título de:

**MAESTRA EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y
COSTEROS**

P R E S E N T A:

Biól. Mar. Josefina Esther Paredes Flores

DIRECTORA:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

CODIRECTOR

Dr. Ernesto García Mendoza

ASESOR

Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza

Tuxpan

2020

Al C. Mtro. Agustín de Jesús Basáñez
Coordinador de la Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Universidad Veracruzana

A través del presente hacemos de su conocimiento que el trabajo de tesis titulado:
“Evaluación de biotoxinas marinas en *Crassostrea virginica* en la laguna de Tampamachoco y la laguna de Tamiahua, Veracruz” que realiza la C. Josefina Esther Paredes Flores, bajo la dirección de la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera, la codirección del Dr. Ernesto García Mendoza y la asesoría del Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza. Ha sido revisada y aprobada para ser presentada en el evento de pregrado de la maestría que usted coordina.

Sin más por el momento enviamos a usted un cordial saludo

ATENTAMENTE

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz 26 de noviembre de 2019



Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Directora de tesis



Dr. Ernesto Gracia Mendoza

Codirector de tesis

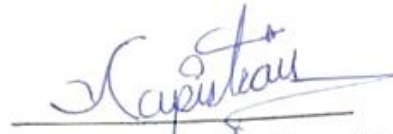


Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza

Asesor de tesis

La presente Tesis titulada "Evaluación de biotoxinas marinas en *Crassostrea virginica* en la laguna de Tampamachoco y la laguna de Tamiahua, Veracruz", realizado por la C. Josefina Esther Paredes Flores, ha sido aprobada y aceptada para tramitar la presentación del examen de grado de MAESTRA EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS.

COMISIÓN LECTORA:



Dr. Ascención Capistrán Barradas

LECTOR



Dra. Maria Elena Castellanos Paéz

LECTOR



Dr. Antonio Almazán Becerril

LECTOR

AGRADECIMIENTOS

*Primero que nada a **Dios** por permitirme de llegar hasta donde estoy por , conocimiento, sabiduría y fuerza para terminar mis estudios, por darme la familia que tengo a mi lado y por cuidarme en cada momento de mi vida.*

*En especial a mi directora de tesis **la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera**, le agradezco a verme aceptado como su tesista, que me haya brindado su apoyo incondicional a pesar de todo, por financiar parte de mi proyecto, su amistad y el tiempo durante el trabajo de tesis.*

*A mi codirector el **Dr. Ernesto García Mendoza** le agradezco que me haya recibido en su laboratorio para la realización de mis muestras y que me allá brindado su experiencia en el análisis y temática de las toxinas marinas.*

*Al **Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza** por estar siempre apoyándome en todo lo que realizo y por brindarme una bella amistad a lo largo de mis estudios.*



Universidad Veracruzana

*A mi **Universidad Veracruzana**; por darme la oportunidad de desarrollar ahí mi formación académica y a cada uno de los maestros que la integran.*



CICESE *Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada** por permitirme realizar mi estancia.*



Al laboratorio de biotecnología ambiental por brindarme un espacio para la revisión de mis muestras de agua y a todos los integrantes de este por brindarme su apoyo y amistad.



*A cada uno de los integrantes del **Laboratorio de análisis, monitoreo e investigación de ficotoxinas asociadas a florecimientos algales nocivos (FICOTOX)** por el apoyo brindado durante mi estancia y en especial a Yaireb Alejandra Sánchez Bravo por el apoyo en la realización de mis resultados, su enseñanza, sus recomendaciones y sugerencias para el mejoramiento de mi tesis.*



***Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; (CONACYT)**, por su apoyo financiero durante los dos año de maestría.*

*A mi comisión revisara, por su contribución al mejoramiento de este trabajo, conformada por la **Dra. María Elena Castellanos Paéz**, el **Dr. Ascención Capistrán** y el **Dr. Antonio Almazán Becerril**.*

A mis compañeros de la maestría Rosa, Anahí, Iris, Say, Katherine, Fernando y Ricardo por brindarme su amistad, apoyo durante y después de la maestría.

DEDICATORIA

A mi abuelita:

Josefina Caudana Cruz que seguirá siendo una de las personas más importante en mi vida aunque no esté con migo, gracias por el amor que me brindado y el apoyo incondicional un te amo y un beso hasta el cielo.

A familia:

Martin Paredes Caudana, Doris Flores Valencia, Martin paredes Flores, Brenda Paredes Flores, Claudia Ivette Escudero Dominguez y Lia Paredes Escudero. Por el apoyo incondicional que me brindaron, sus sabios consejos y ayuda brindada, también les agradezco por su amor, respeto y confianza que depositaron en mí y por estar con migo en cada momento de mi vida, los amo.

A mi mejor amiga:

Rosa Ivette Vazquez Estrada primero que nada agradecerte por motivarme a estudiar la maestría y por todo el apoyo que me brindaste a lo largo de toda la maestría. Por tu compañía, cariño que me has brindado todos estos años eres una gran amiga y agradezco a dios el haberte conocido y llegar a ser tu amiga. Gracias por estar con migo en cada momento y en especial cuando más te necesitaba eres la mejor amiga que he tenido y que me apoya incondicionalmente y sobre todo por los momentos que hemos pasado juntas. Te quiero mucho siempre estarás en mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN.....	ix
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- ANTECEDENTES	6
2.1.- Toxina Paralizante	6
2.2.- Ácido Domoico.....	10
2.3.- Espirólidos	11
2.4.- Gimnodiminas	12
2.5.- Pectenotoxinas	12
2.6- Toxinas en México	13
2.6.1.- Océano Pacífico (Pacífico Mexicano y Golfo de California).....	13
Pacífico Mexicano	13
Golfo de California.....	14
2.6.2.- Océano Atlántico (Caribe Mexicano y Golfo de México)	14
Caribe Mexicano.....	14
Golfo de México.....	15
III.-HIPÓTESIS.....	18
IV.- OBJETIVOS.....	19
Objetivo general:	19
Objetivos particulares	19
V.- AREA DE ESTUDIO	20
4.1.- Laguna de Tampamachoco	20
4.2.- Laguna de Tamiahua.....	22
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1.- Colecta de muestras.....	25
5.2.- Identificación de Especies con Potencial Toxico.....	25
5.3.- Determinación de toxinas.....	26
5.3.1.- Determinación de Toxina Paralizante.....	26
5.3.1.1.- Bioensayo en ratón.....	26
5.3.1.2.- Pruebas rápidas Scotia Rapid Testing.....	29
5.3.2.- Determinación de Toxinas lipofílicas y ácido domoico	31
VII.-RESULTADOS	32
6.1.- Especies potencialmente toxicas.....	32

6.2.- Determinación de toxinas.....	32
6.2.1.- Toxinas Paralizantes	32
6.2.1.1.- Bioensayo en ratón.....	32
6.2.1.2.- Pruebas rápidas.....	32
6.2.2.- Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	34
6.2.2.1- Toxinas lipofílicas	34
VIII.- DISCUSIÓN.....	41
IX.- CONCLUSIONES	47
X.- APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO.....	48
XI.- BIBLIOGRAFÍA.....	50
XIV.- ANEXO.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de los elementos estructurales de un canal de sodio activado por un voltaje (Tomada de Wiese et al., 2010).....	7
Figura 2.- Ubicación de los sitios de colecta en la Laguna de Tampamachoco, Tuxpan, Veracruz.....	21
Figura 3.- Ubicación de los sitios de colecta en la Laguna de Tamiahua, Veracruz.	23
Figura 4.- Guía de interpretación de las pruebas rápidas.	30
Figura 5.- Resultados negativos de la prueba rápida de PSP en 30 muestras de carne de ostión de las dos lagunas.	33
Figura 6.- Concentración de gimnodiminas en ostión (C. virginica) colectados en la laguna de Tampamachoco.....	34
Figura 7.- Concentración de espirolidos en ostión (C.virginica) colectados en la laguna de Tampamachoco.....	35
Figura 8.- Concentración de pectenotoxinas en ostión (C.viginica) en la laguna de Tampamachoco.	36
Figura 9.- Concentración de gimnodiminas en ostión (C.viginica) en la laguna de Tamiahua.	37
Figura 10.- Concentración de espirolidos en ostión (C.viginica) en la laguna de Tamiahua.	38
Figura 11.- Concentración de pectenotoxinas en ostión (C.viginica) en la laguna de Tamiahua.	39
Figura 12.- Concentración de ácido domoico en ostión (C.viginica) en la laguna de Tamiahua.	40

RESUMEN

Paredes-Flores Josefina Esther

En el presente trabajo se evaluó la presencia de biotoxinas marinas en el ostión *Crassostrea virginica* extraído de las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua en el estado de Veracruz. Mediante bioensayo en ratón y pruebas rápidas se evaluó la presencia de toxinas paralizantes y mediante cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS) se detectaron toxinas lipofílicas y ácido domoico en muestras colectadas mensualmente de julio del 2018 a febrero del 2019 en ambas lagunas. Asimismo, se colectaron muestras de agua mediante arrastre con una red de fitoplancton para la detección de *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium* géneros potencialmente productores de biotoxinas paralizantes, con un microscopio óptico. Se confirmó por primera vez la presencia de toxinas de tipo amnésico (ácido domoico) y las toxinas lipofílicas pectenotoxinas, espirolidos y gimnodiminas en la zona norte del estado de Veracruz en las lagunas Tampamachoco y Tamiahua. Los espirolidos presentaron concentraciones máximas en julio de 10.09 µg/kg, agosto 11.39 µg/kg y septiembre 10.77 µg/kg. La concentración de gimnodiminas en diciembre fue de 14.56 µg/kg y en febrero de 12.4 µg/kg y se detectó una concentración de pectenotoxinas de 0.38 µg/kg en diciembre para las muestras de Tampamachoco. Mientras que en el tejido de ostión de Tamiahua, se encontraron espirolidos con valores máximos en septiembre de 1.76 µg/kg y en octubre de 4.33 µg/kg. En el caso de las gimnodiminas en agosto se detectaron 0.18 µg/kg y en noviembre 0.21 µg/kg. Las pectenotoxinas presentaron en diciembre una concentración de 0.17 µg/kg y el ácido domoico en agosto de 13.76 µg/kg y en noviembre de 14.45 µg/kg. No se detectó la toxina de tipo paralizante en ninguna de las muestras.

Palabras Clave: *Crassostrea virginica*, biotoxinas, ácido domoico

I.- INTRODUCCIÓN

El fitoplancton es un conjunto de microorganismos que viven suspendidos en la columna de agua en ambientes continentales, estuarinos y marinos, además algunas de sus especies son indicadoras de la calidad del agua y de los ecosistemas, mientras que otras producen toxinas (Esqueda-Lara *et al.*, 2016). Este grupo de organismos son el primer eslabón en la cadena alimenticia y algunas de estas especies se caracterizan por generar toxinas, particularmente son producidas por los dinoflagelados y algunas diatomeas que forman parte del fitoplancton marino (Rey-López, 2017).

En la actualidad, se conoce la descripción de más de 4,000 especies de fitoplancton, considerando a los dinoflagelados como el grupo más abundante y diverso después de las diatomeas (Parra-Toriz *et al.*, 2011). Los dinoflagelados comprenden unas 2,000 especies conocidas, y aproximadamente 60 especies producen potentes toxinas citolíticas, hepatotóxicas o neurotóxicas (Gómez *et al.*, 2011).

Concretamente, los dinoflagelados conforman una fracción importante dentro de los productores primarios de la cadena trófica; son organismos unicelulares eucarióticos, que pueden desarrollarse en forma simbiótica, parasitaria, además de utilizar hábitats planctónicos o benthicos de manera indistinta (Hoppenrath *et al.*, 2014). Un florecimiento algal nocivo (FAN), es un incremento masivo en el número de algunas células fitoplanctónicas que puede consumir el oxígeno o los nutrientes del agua, y esto puede afectar a otros organismos (Band-Schmidt *et al.*, 2011).

Las toxinas producidas durante los FAN son acumuladas en organismos filtradores, principalmente en moluscos bivalvos que son los organismos vectores más comunes para que las toxinas producidas lleguen a través de la red trófica al ser humano (Sunesen *et al.*, 2014). Las toxinas marinas son compuestos químicos que son biosintetizados por algunas especies de fitoplancton y estas causan impactos negativos en los organismos marinos, provocando algunas veces la mortalidad de vertebrados (peces, aves y mamíferos), amenazando tanto a la salud humana como a la seguridad alimentaria y nutricional (Ferreira *et al.*, 2018). Se han identificado intoxicaciones provocadas por los dinoflagelados y algunas especies de diatomeas cuyas toxinas pueden ingresar a las redes tróficas afectando la salud humana por ingesta de productos pesqueros (Mancera-Pineda *et al.*, 2014).

Los principales síndromes tóxicos producidos por las microalgas que han sido descritos hasta la fecha y que afectan directamente al ser humano son: intoxicación por microcistinas producidas por algas verde-azuladas (cianobacterias) en aguas salobres y lacustres, Intoxicación Amnésica por consumo de mariscos (ASP), Intoxicación Neurotóxica por consumo de mariscos (NSP), Intoxicación Diarreica por consumo de mariscos (DSP), Intoxicación Paralizante por consumo de mariscos (PSP) y la Ciguatera, que es una intoxicación producida por el consumo de pescado (Anderson *et al.*, 2012; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2015; García-Mendoza *et al.*, 2016). Todos estos síndromes son causados por biotoxinas sintetizadas por dinoflagelados, excepto la toxina causante de intoxicación amnésica por consumo de mariscos (ASP): ácido domoico (AD). Esta neurotoxina es producida por

diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Anderson, 2009). No obstante, el número de toxinas que se descubren y su sintomatología va en incremento día con día (Marín *et al.*, 2013).

Los moluscos bivalvos se alimentan filtrando partículas suspendidas en el agua y pueden acumular toxinas en sus tejidos que pueden potencialmente provocar envenenamientos en el humano cuando son consumidos (Gersen *et al.*, 2010). Los moluscos no son afectados por las toxinas paralizantes ya que son relativamente insensibles a las toxinas PSP porque muchos de ellos tienen nervios y músculos que trabajan con canales de calcio mientras que la STX y otras toxinas paralíticas bloquean solo canales de sodio y los bivalvos en general cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje eso les permite continuar con su alimentación y acumular grandes cantidades de toxinas (López-Cuevas, 2013). Los moluscos son una fuente de proteínas para el consumo humano y representan un recurso valioso en términos de economía local y regional para las poblaciones costeras (Braga *et al.*, 2018).

Las toxinas paralizantes de moluscos (PSP) son un grupo de potentes neurotoxinas marinas producidas por dinoflagelados naturalmente tanto en agua dulce como en ambientes marinos (Abi-Khalil *et al.*, 2017). Dentro del grupo de toxinas paralizantes, la Saxitoxina es la de mayor grado de toxicidad que se describe como una potente toxina neuromuscular soluble en agua (Marín *et al.*, 2013). La intoxicación amnésica por consumo de mariscos producida por el Ácido domoico

puede causar la pérdida de memoria asimismo, se pueden presentar síntomas graves de tipo gastrointestinal y en casos graves puede causar la muerte (Wright *et al.*, 1989). Dentro del grupo de toxinas lipofílicas se encuentran los espirólidos y las gimnodiminas que son compuestos macrocíclicos con un grupo imino como parte de su estructura cíclica y no se conoce el efecto en humanos, pero eso no quiere decir que no sean un riesgo para la salud humana y no están reguladas (Pulido, 2011)

La zona norte de Veracruz en especial para la Laguna de Tampamachoco y la laguna de Tamiahua se han reportado las especies que producen toxinas, como los dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium* que están asociados al PSP y las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* asociados al DSP es por ello que debemos realizar más estudios relativos para investigar el potencial de las toxinas presentes en las aguas del Golfo de México (Figuroa-Torres y Weiss-Martínez, 1999; Mier *et al.*, 2006; Orduña-Medrano 2012; Pérez-Olmedo 2014 y 2017; Poot-Delgado *et al.*, 2015).

Por otra parte, México es un país productor de moluscos y una de las especies de ostión cultivado para la comercialización es el ostión americano *C. virginica* el cual sostiene una pesquería y se cultiva de forma extensiva, formando una parte significativa en la producción nacional ostrícola la cual representa el 90% en el golfo de México (Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2013). Las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua son de las principales en el estado de Veracruz donde

se obtiene el 89% de la pesca de ostión registrada para este estado (Arías, 2014). El ostión es un recurso acuático de importancia comercial y una fuente de ingreso para las comunidades regionales que lo extraen (Vidal-Briseño, 2015).

Este estudio se efectuó debido a la importancia del potencial de afectación por parte de las toxinas generadas por el fitoplancton presentes en los cuerpos de agua (Laguna de Tampamachoco y Laguna de Tamiahua) y si los ostiones las están acumulando ya que no se han efectuado estudios para esta región del Golfo de México. En este contexto, en el presente trabajo se determinó la presencia de toxinas en los ostiones (*C virginica*) de las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua. La información resultante del estudio servirá de guía para el buen manejo del recurso ostrícola en esas Lagunas.

II.- ANTECEDENTES

Las biotoxinas marinas son producidas por especies de microalgas, se clasifican de acuerdo con los principales signos y síntomas que producen en el humano, se han reconocido ficotoxinas marinas paralizantes, neurotóxicas, amnésicas, diarreicas, ciguatoxinas y azaspirácidos (Sánchez-Bravo *et al.*, 2016).

Las biotoxinas se clasifican de acuerdo a su naturaleza química y propiedades físicas en hidrofílicas e hidrofóbicas (lipofílicas), en el grupo de las toxinas hidrofílicas están las toxinas de tipo amnésico (ASP) y las toxinas de tipo paralítico (PSP) y las toxinas lipofílicas son las toxinas diarreicas (DSP), yesotoxinas (YTX), azaspirácidos (AZA), pectenotoxinas (PTX), gimnodiminas (GYM), espirólidos (SPX) y brevetoxinas (PbTX), (Botana, 2014).

2.1.- Toxina Paralizante

La intoxicación paralizante de moluscos es producida principalmente por los dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* las cuales son acumuladas por organismos que se alimentan por filtración (Shin *et al.*, 2017).

El grupo de toxinas paralizantes está conformada por más de 57 derivados de tetrahidropurina y se pueden dividir en cuatro categorías: las toxinas N-sulfocarbamoilo, descarboxilo, desoxidecarbamoilo y carbamato, la última de las cuales incluye saxitoxina (STX) (Wiese *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción de la toxina se produce cuando se unen los canales de sodio (Na) regulados por el voltaje en una proporción equimolar, mediado por la

interacción entre los grupos de guanidinio cargados positivamente con grupos carboxilo cargados negativamente en el sitio uno del canal de sodio, bloqueando así el poro y evitando el flujo de iones de sodio a través de la membrana (Figura1) (Wiese *et al.*, 2010).

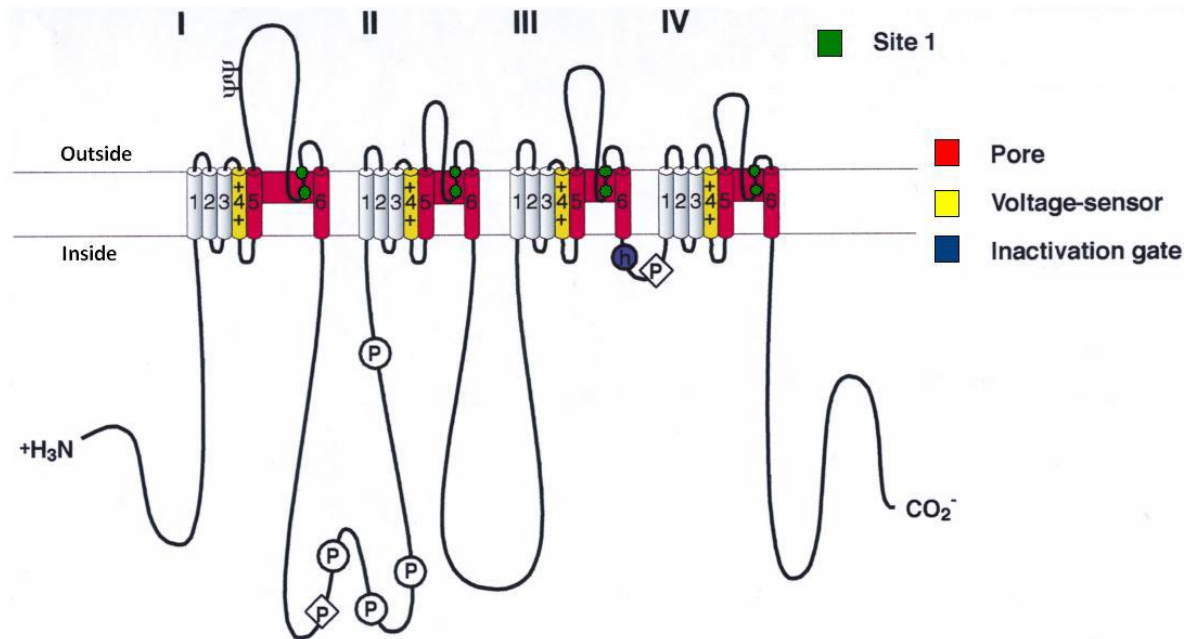


Figura 1.- Esquema de los elementos estructurales de un canal de sodio activado por un voltaje (Tomada de Wiese *et al.*, 2010).

Se realizó un estudio sobre la identificación y cuantificación en quistes de dinoflagelados tóxicos en los sedimentos y la presencia de microalgas productoras de toxinas en el plancton donde se efectuó la detección de la toxina paralizante mediante el ensayo en ratón donde se analizó un total de 54 muestras de distintas especies de moluscos *Concholepas concholepas* (loco), *Mytilus chilensis* (chorito) y *Venus antiqua* (almejas) para determinar la concentración del veneno paralizante de los mariscos y el 24% estaba debajo del límite de detección del

bioensayo (30 μg STX eq 100 g^{-1}), el 44% bajo el límite regulatorio (80 μg STX eq. 100 g^{-1}) y el 32% sobre el límite regulatorio (Seguel y Sfeir, 2010).

En Chile se utilizó un ensayo funcional de electrofisiológico en los tejidos de los organismos *Choromytilus chorus* de bancos naturales alcanzando concentraciones altas (163 a 292 μg STX eq/100 g de tejidos) (Ortiz-Castro, 2013). En la parte del Golfo de Penas y canal Trinidad las toxinas detectadas con mayor frecuencia en muestras de moluscos sin hidrolizar fueron GTX2-3 GTX1-4 STX y neo-STX y las muestras hidrolizadas demostraron también la presencia de toxina C1, C2, C3 además de GTX5 y después de someter los extractos a hidrólisis fuerte, aparecieron GTX2, GTX3, GTX1 y STX (Pizarro *et al.*, 2011).

Adicionalmente se efectuó una comparación entre 25 laboratorios utilizando la técnica de bioensayo en ratón para la detección de toxina paralizante en moluscos esto para examinar el rendimiento general de las pruebas PSP y analizar los principales factores que afectan el rendimiento donde demuestran que el bioensayo de ratón PSP es un método apropiado para detectar y probar la toxicidad de PSP en mariscos (Cao *et al.*, 2011). Así como estudios de fitoplancton y mariscos en los que se detectó la toxina paralizante de moluscos de (<0.5 nmol L⁻¹), y estas estaban dominadas por toxinas de bajo contenido de N-sulfocarbanoil C1 / 2, con trazas de GTX1 / 4 y GTX2 / 3. Sin embargo, los perfiles de toxinas de dos muestras de fitoplancton de (3.25 nmol L⁻¹) y (2.68 nmol L⁻¹) estuvo dominada por GTX1 / 4 (80%), GTX2 / 3 (11%) y C1 / 2 (9%) (Liu *et al.*, 2017).

En el estudio realizado por Shin *et al.*, 2017 utilizó el método de LC-ESI-MS / MS en mariscos y tunicados, para la determinación de 5 toxinas PSP (STX, GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4). De igual manera Shin *et al.*, 2018 utilizó el mismo método LC-MS / MS para determinar cinco toxinas paralizantes (STX, GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4) en moluscos individuales donde se evaluó la exposición humana aguda y crónica a la toxina paralizante de moluscos a través del consumo de mariscos.

Se han de desarrollado sensores químicos potenciométricos para la detección de la toxina paralizante de moluscos en el cual se eligió la saxitoxina, decarbamoil saxitoxina, gonyautoxina GTX5 y C1 y C2 donde los límites de detección estuvieron en el rango de 0.25 a 0.9 μmolL^{-1} para saxitoxina y decarbamoil saxitoxina y de 0.08 a 1.8 μmolL^{-1} para GTX5 y C1 y C2 (Ferreira *et al.*, 2018).

Además se evaluó el impacto del cambio climático relevante *per se* y su efecto combinado en la dinámica de la acumulación y eliminación de toxina paralizante en *Mytilus galloprovincialis* que estuvieron expuestos a la toxina paralizante de moluscos (PSP) que produce el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* y fueron aclimatados a cuatro condiciones: cambio climático, condiciones actuales, calentamiento y acidificación durante 5 días con una dieta no tóxica durante los 10 días posteriores donde se obtuvieron altos niveles de toxicidad en condiciones actuales (1493 $\mu\text{g STX eq. Kg}^{-1}$) que superan los límites de seguridad, para el calentamiento y los mejillones aclimatados se registraron niveles de toxicidad PSP significativamente menores (661 y 761 $\mu\text{g STX eq. Kg}^{-1}$) y para el efecto combinado

tanto del calentamiento como de la acidificación dio como resultado valores de toxicidad PSP ligeramente más altos (856 μg STX eq. Kg^{-1}) (Braga *et al.*, 2018).

De igual manera Cruz *et al.*, 2018 examinó la toxina paralizante de moluscos (PSP) en extractos de mejillón mediante sensores químicos potenciométricos los que respondieron a la STX y dcSTX, GTX5 y C1 y 2 y los límites de detección estaban en los rangos de 0.2-0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para STX y dcSTX, y 0.08-1.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para GTX5 y C1 y 2.

2.2.- Ácido Domoico

El ácido domoico (AD) es un aminoácido cíclico con un peso molecular de 311 Da que posee tres grupos carboxilo y un grupo amino secundario (Wright *et al.*, 1989). En Canadá el primer evento de intoxicación por ácido domoico fue en 1987 por ingesta de mejillones azules (*Mytilus edulis*) que se atribuyó a la diatomea *Pseudo-nitzschia* (Bates *et al.*, 1998).

En la costa central de California entre mayo y junio de 1998 se registraron 400 muertes de lobos marinos que presentaron signos de desorientación o problemas neuronales asociados a la intoxicación por Ácido domoico (Schollin *et al.*, 2000). Este ha sido uno de los eventos de intoxicación más severos registrados en la costa oeste de USA, donde la abundancia de *Pseudo-nitzschia* fue mayor de 106 cel L^{-1} y se detectó una concentración máxima de toxina de 7,300 ng AD L^{-1} en muestras de material particulado (Trainer *et al.*, 2000).

La producción de ácido domoico puede variar de una especie a otra y entre la misma especie procedente de diferentes regiones, por ejemplo, *P pseudodelicatissima* de la Bahía de Fundy (Canadá) produjo niveles altos de AD en molusco, mientras que cepas de la misma especie aisladas de la Bahía de Galveston en Texas, Bahía de Massachusetts y Bahía de Monterey en California no producen esta toxina (Bates, 2000).

En 2009 en diferentes zonas de Filipinas, Vietnam, Tailandia y la isla de Ishigaki, Japón se recolectaron especies de bivalvos al azar y este es el primer reporte de ácido domoico en aguas tropicales (Lirdwitayaprasit *et al.*, 2009)

Hernández en 2017, realizó un estudio de las toxinas en bancos naturales de bivalvos al sur de la bahía de la Paz donde se encontraron toxinas hidrofílicas como la saxitoxina y sus análogos, el ácido domoico y toxinas lipofílicas como la ciguatoxina y el ácido okadaico, en donde se utilizó el bioensayo en ratón y se determinó su perfil con los métodos de HPLC-FD y LC- MS/MS, detectándose 15 toxinas lipofílicas, con valores máximos de 6.3 µg de AO kg⁻¹ de tejido de moluscos, 8.2 µg de PTX kg⁻¹, 0.8 µg de AZA kg⁻¹, 22.5 µg de h-YTX kg⁻¹, 11.3 µg de SPX kg⁻¹, 42.6 µg de GYM kg⁻¹ y 10.5 µg de PnTXG kg⁻¹. A excepción del AD y sus análogos, las toxinas lipofílicas detectadas no son reguladas en México.

2.3.- Espirólidos

La toxicidad de los espirólidos fue detectada por primera vez en Nueva Escocia, Canadá en un extracto metanólico de glándulas digestivas de mejillones (*Mytilus edulis*) y vieiras (*Placopecten magellanicus*) (Hu *et al.*, 1996). Esto evidenció una

toxicidad elevada de los espirólidos en los organismos y fue en el 2000 que se identificó a *Alexandrium ostenfeldii* como organismo productor de ésta toxina (Cembella *et al.*, 2000) Los espirólidos no se consideran en las regulaciones sanitarias ya que no se ha comprobado que exista un efecto nocivo en humanos y por lo tanto, no existen reportes de intoxicaciones asociadas (Otero *et al.*, 2011).

2.4.- Gimnodiminas

Las gimnodiminas se detectaron por primera vez en ostras *Tiostrea chilensis* de Nueva Zelanda mediante ensayo de ratón y su estructura química fue caracterizada por medio de resonancia magnética nuclear (Seki *et al.* 1995). Las toxinas se presentan de manera recurrente en las costas de Nueva Zelanda y además se han encontrado acumuladas en más de una especie de bivalvos (mejillones, pectinidos y abulones) (Stirling, 2001). La gimnodimina mostró una alta toxicidad 96 µg / kg por inyección; 755 µg / kg por administración oral; sin embargo, la toxicidad se redujo significativamente cuando se administró con alimentos (Kong *et al.*, 2011).

2.5.- Pectenotoxinas

Las pectenotoxinas son producidas por el género *Dinophysis*, esta toxina se halla asociada a la Intoxicación Diarreica por consumo de mariscos (DSP) por su estructura química (Fabro *et al.*, 2015).

La Pectenotoxina 1 (PTX1), son compuestos tipo poliéter lactona, el nombre se debe a la glándula digestiva que fue aislada de la vieira *Patinopecten yessoensis* en el nordeste del Japón, posteriormente se descubren diversos homólogos (PTX2,

PTX3, PTX6, PTX4 y PTX6, PTX7, PTX8, PTX9 y PTX10) (Otero, 2003). Las pectenotoxinas y las yessotoxinas aunque no producen cuadros diarreicos se incluyen en el complejo DSP por su común propiedad de solubilidad en lípidos, y están sometidas a las mismas normas legales que el AO y derivados (Otero, 2003).

2.6- Toxinas en México

2.6.1.- Océano Pacífico (Pacífico Mexicano y Golfo de California)

Pacífico Mexicano

El dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* se distribuye a lo largo del Pacífico Mexicano y es un productor de toxinas paralizantes (Band-Schmidt *et al.*, 2010). Durante esta investigación se efectuó un análisis de los estudios realizados en México relacionados con este dinoflagelado, que fueron *in vitro* de cepas de *G. catenatum* de diferentes bahías a lo largo de la costa del Pacífico de México, los resultados muestran que esta especie puede proliferar en amplios rangos de salinidades, temperaturas y proporciones de N: P, observando diferencias de latitud en el perfil de toxicidad y toxinas, pero la presencia de dcSTX, dcGTX2-3, C1 y C2 son componentes habituales (Band-Schmidt *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Alonso-Rodríguez *et al.*, 2015 en Oaxaca se encontró toxina paralizante expresada como mg STX eq. Kg de tejido de ostión que superó el límite máximo permisible para el consumo humano (800 mg STX eq. Kg).

Golfo de California

El análisis de toxinas en muestras de red revelaron la presencia de toxinas del grupo sulfocarbamoil (toxinas B1, C1 y C2), carbamoil (saxitoxina, neosaxitoxina y goniautoxinas 2 y 3) y decarbamoiladas (decarbamoilgoniautoxina-3) (Hernández-Sandoval *et al.*, 2009).

2.6.2.- Océano Atlántico (Caribe Mexicano y Golfo de México)

Caribe Mexicano

El conocimiento de los dinoflagelados bentónicos es muy limitado y sólo se cuenta con registros de algunas especies potencialmente tóxicas como *Gambierdiscus toxicus* en muestras de Puerto Morelos, Majahual, Xcalak, Xel-Ha, Isla Mujeres, Cancún y Bahía de la Ascensión; mientras que *G. belizeanus*, se ha reportado en Puerto Morelos y *G. yasumotoi* en muestras de Bahía de la Ascensión; asimismo *Prorocentrum mexicanum*, *P. lima*, *P. reutzlarianum*, y *P. belizeanum* (Almazán-Becerril, 2000; Hernández-Becerril y Almazán-Becerril, 2004).

La probable existencia de nuevas especies en la zona es un reflejo de la diversidad de dinoflagelados bentónicos que albergaría el Caribe Mexicano (Almazán-Becerril *et al.*, 2012). Se cuenta con el registro bibliográfico de la existencia de al menos 30 especies para el Caribe y también se puede considerar una alta probabilidad de generar nuevos registros de especies reportadas en otras áreas tropicales. Un

ejemplo sería, *G. yasumotoi* que fue identificado en el Caribe Mexicano (Hernández-Becerril y Almazán-Becerril, 2004).

Golfo de México

Asimismo Barón-Campis *et al.*, 2014 reportaron 17 especies de dinoflagelados dentro de las cuales seis son potencialmente tóxicas y pueden representar un riesgo en la maricultura y las principales pesquerías por su naturaleza ictiotóxica, entre las que destacaron *Karenia brevis*, *Karenia cf. mikimotoi*, *Gambierdiscus* spp., *Ostreopsis* sp., y *Prorocentrum mínimum*.

Se detectaron toxinas PSP (decarbomoil goniatoxina-2, 3, goniatoxina-2 y 3, neosaxitoxina y saxitoxina (dcGTX2-3, dcGTX2-3, NeoSTX y STX) (Núñez-Vázquez *et al.*, 2013), además se realizó un estudio de un ciclo anual del fitoplancton en las especies potencialmente nocivas en bancos ostrícolas de la laguna de Términos en el cual se reportaron 114 especies de las cuales 14 pertenecen a los dinoflagelados donde se encuentran *Alexandrium* sp., *Gymnodinium cf. catenatum* y *Peridinium quinquecorne*, que son las principales especies que provocan el envenenamiento paralizante de moluscos (Poot-Delgado *et al.*, 2015).

Para la zona norte de Veracruz, se elaboraron estudios de la composición taxonómica de los dinoflagelados de la laguna costera de Tamiahua, señalando su papel como organismos tóxicos y formadores de mareas rojas, reportando 35

especies de las cuales 23 fueron nuevos registros para la zona de estudio, 24 han sido reportadas como formadoras de marea roja y siete corresponden a especies tóxicas (*Amphidinium carterae*, *Gymnodinium breve*, *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum micans* y *Prorocentrum minimum*) Figueroa-Torres y Weiss-Martínez (1999), así como el estudio de los patrones de distribución y abundancia del fitoplancton nocivo en la zona costera de Tuxpan, Veracruz en un ciclo anual, reportando un total de 265 especies de fitoplancton, de las cuales 86 pertenecen a los dinoflagelados, donde se encontraron los tres géneros *Gymnodinium*, *Alexandrium* y *Pyrodinium* que provocan la toxina paralizante de moluscos (Orduña-Medrano, 2012).

Posteriormente se reportaron 130 especies de las cuales 18 corresponden a especies potencialmente tóxicas entre las que se encuentran especies del género *Pyrodinium* (Pérez-Olmedo, 2014), éste autor, también realizó una evaluación de la composición y abundancia de especies tóxicas y nocivas de dinoflagelados causantes de mareas rojas en la zona costera de Tuxpan, en la cual se encontraron 17 especies de dinoflagelados reportados como tóxicos, asociados a la formación de mareas rojas y los tres géneros que producen la toxina paralizante de moluscos (Pérez-Olmedo, 2017).

Todos los reportes demuestran la existencia de comunidades microplantónicas. Sin embargo, se necesitan efectuar más estudios para: a) incrementar el conocimiento

del fitoplancton presente en las zonas de estudio, b) determinar su grado de toxicidad, y c) que efectos ocasionaría si hubiera un incremento de dichas especies. Por las razones anteriores, el presente trabajo tiene como propósito el evaluar las biotoxinas marinas presentes en moluscos en las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua.

III.-HIPÓTESIS

En las aguas costeras del norte de Veracruz, específicamente en las aguas costeras de Tuxpan y Tamiahua, se ha registrado diversas especies con potencial toxico. Asimismo, se pudieran reportar casos de intoxicación tras el consumo de moluscos como el ostión (*C virginica*), ya que estos funcionan como reservorios por el proceso de filtración que conlleva su alimentación, es por ello que:

Ha. Debido a que se han reportado especies potencialmente toxicas es probable que se encuentren toxinas en niveles mínimos o máximos según la NOM-242-SSA-2009 en *C virginica* en las Lagunas de Tampamachoco y Tamiahua.

IV.- OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la presencia de ficotoxinas en organismos de bancos de ostión *Crassostrea virginica* existentes en la Laguna de Tampamachoco y la Laguna de Tamiahua, Veracruz.

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de las especies fitoplanctónicas con potencial tóxico en muestras de agua.
- Determinar la presencia de toxinas paralizantes mediante bioensayo en ratón y pruebas rápidas (Scotia Rapid Testing) en extractos de cuerpo completo de ostión.
- Comprobar la presencia de toxinas lipofílicas por medio Cromatografía Líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en extractos de cuerpo completo de ostión.
- Comparar si las concentraciones presentes en los moluscos de la región sobrepasan los límites máximos permitidos por la entidad regulatoria.

V.- AREA DE ESTUDIO

4.1.- Laguna de Tampamachoco

La laguna de Tampamachoco, se localiza entre los paralelos 20° 58' 15" y 21° 05' de latitud norte y los meridianos 97° 20' 30" a 97° 24' de longitud oeste y se ubica en la región huasteca, en la Llanura costera del Golfo de México, en el estado de Veracruz, por la carretera federal N° 180: en la ciudad de Tuxpan, con 74, 527 habitantes; estado de Veracruz (INEGI, 2001) (Figura 2).

La laguna es de forma alargada y paralela a la línea de la costa, el sistema cuenta con una longitud de 11 km y con una anchura máxima de 1,300 m²aproximadamente, está separada del Golfo de México por una barrera arenosa de nombre "Barra Galindo", situada al norte de la laguna, con anchura máxima de 2.67 km y mínima de 1.3 km (Reguero *et al.*, 1991).

El sistema lagunar se comunica hacia el norte con la Laguna de Tamiahua mediante un canal de navegación natural llamado El Viejo y uno artificial de nombre El Nuevo; al noroeste se ubica la desembocadura del estero El Angosto y al sur la del Río Tuxpan (Reguero *et al.*, 1991; Orduña- Medrano 2012).

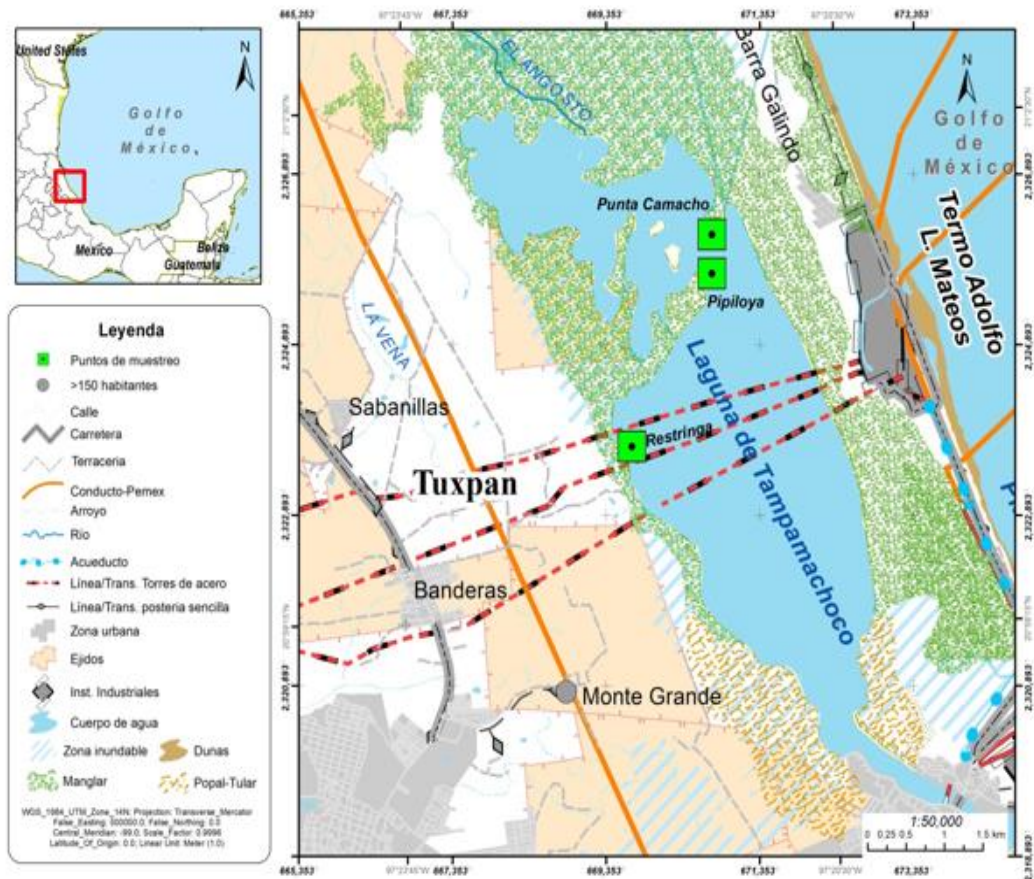


Figura 2.- Ubicación de los sitios de colecta en la Laguna de Tampamachoco, Tuxpan, Veracruz

La Laguna de Tampamachoco recibe aportes de agua dulce en su porción septentrional por el estero El Corral, que vierte su contenido en los canales de navegación El Viejo y El Nuevo; del noroeste provienen de los esteros El Corral y El Angosto; de este último existen escurrideros estacionales entre el rancho Oro Negro y Punta Potrero y frente al poblado de Tampamachoco. En la parte meridional se ubica la desembocadura del Río Tuxpan. Por la influencia de las mareas en la laguna, el agua adopta forma de cuña, que ejerce efecto hasta una distancia

aproximada de 30 km hacia la parte interna del Río Tuxpan (Reguero *et al.*, 1991; Orduña- Medrano 2012).

Se eligieron tres bancos ostrícolas (Pipiloya, Restringa y Punta de Madero) ya que son de los bancos con mayor extracción en la Laguna de Tampamachoco y los estudios que se han realizado por otros autores de la comunidad fitoplanctónica se ubicaron cerca de esos bancos de ostión.

4.2.- Laguna de Tamiahua

La laguna de Tamiahua se encuentra en el norte del estado de Veracruz y se ubica en las coordenadas geográficas: 20° 57' 36" a 22°06'32" N y 97° 18'41" a

97°46'17"O y cuenta con una superficie de 1,405 km² (López-Portillo, 2012) (

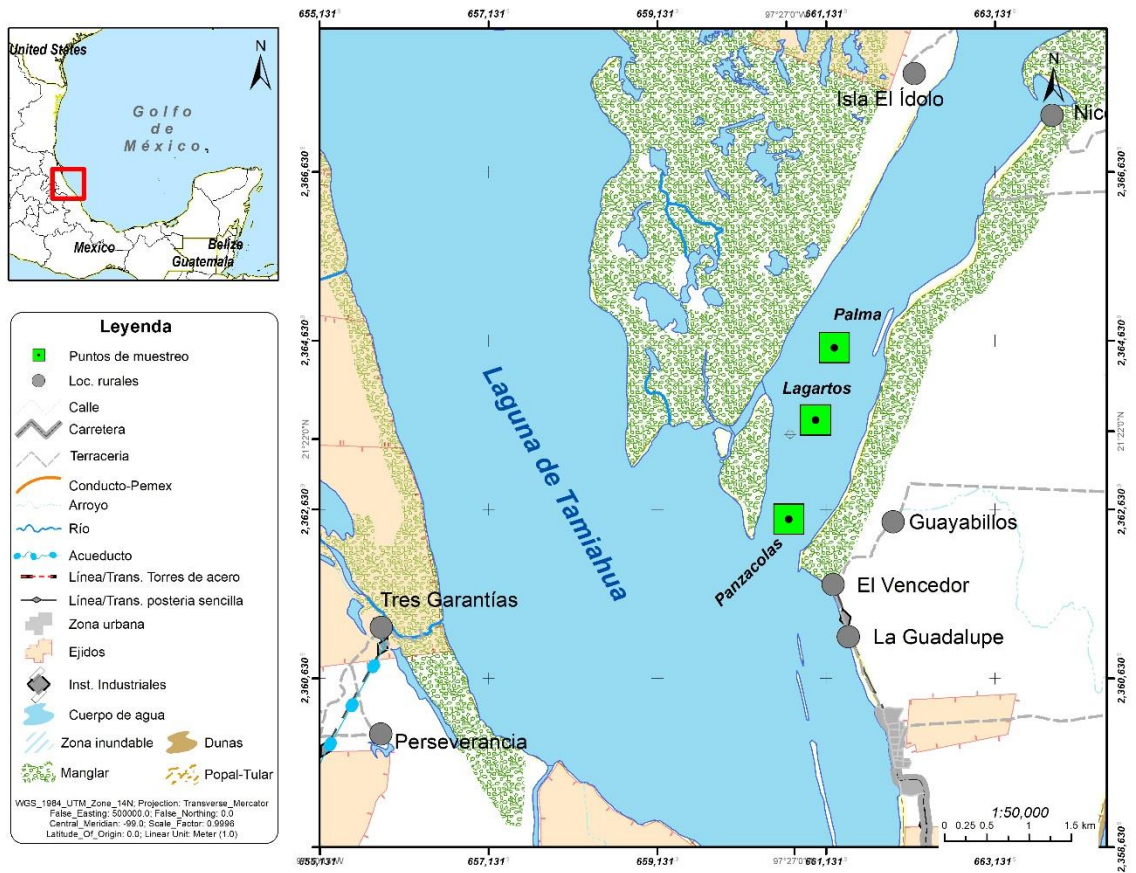


Figura 3).

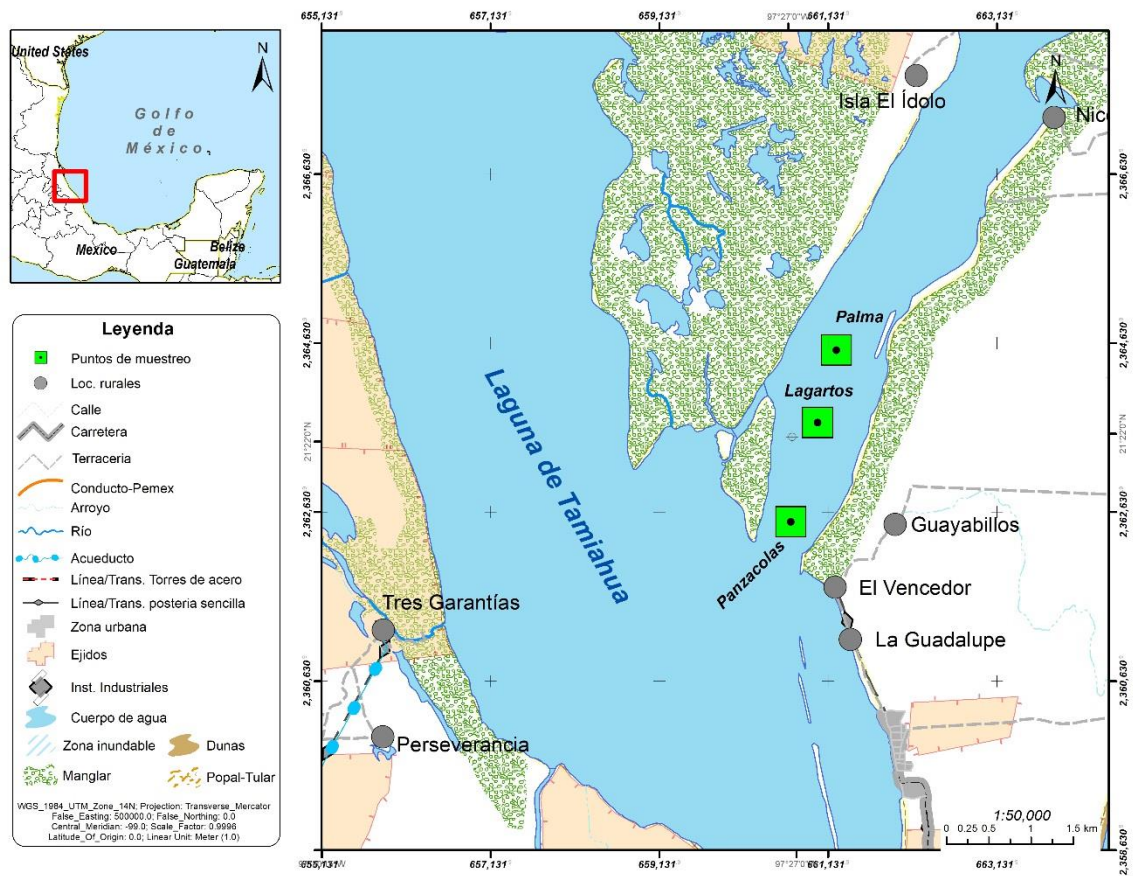


Figura 3.- Ubicación de los sitios de colecta en la Laguna de Tamiahua, Veracruz.

Limita al Norte con el Río Panuco y al Sur con el Río Tuxpan, posee una forma alargada en el eje mayor, orientado del noreste al sureste. Tiene una profundidad de 2 y 3 m y una longitud de 85 km y una anchura máxima de 18 km; ocupa un área de 88,000 hectáreas aproximadamente y por su extensión es la tercera más grande del país (Contreras y Castañeda, 2004).

El clima corresponde Am (f) cálido húmedo, temperatura media anual de entre 22° y 26° C y la temperatura del mes más frío es mayor a 18 ° C y la precipitación del

mes más seco es menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2% del total anual (López-Portillo, 2012).

Se eligieron tres bancos ostrícolas (Panzacolas, Lagartos y Palma) ya que son de los bancos con mayor extracción en la Laguna de Tamiahua.

.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Colecta de muestras

Se realizaron muestreos mensuales de julio 2018 a febrero 2019 en tres bancos de extracción de ostión en cada laguna y se colectaron aproximadamente 80 ejemplares del ostión (*C. virginica*) para la laguna de Tampamachoco y 50 ejemplares para la Laguna de Tamiahua para la detección de la saxitoxina. Asimismo, se colectaron muestras de agua superficial durante el mismo periodo de muestreo en frascos de 500 ml a una profundidad de no más de 30 cm y estas se fijaron con lugol al 100% (Vicente *et al.*, 2005) aplicando una gota por cada 100 ml (Méndez-Torres, 2016).

Posteriormente, se realizó un arrastre por cada banco de ostión, el cual se efectuó de manera circular durante cinco minutos se colectaron 500 ml de muestra a la mínima velocidad del motor de la lancha, con ayuda de una red de arrastre de fitoplancton de 60 micras de apertura de malla. Las muestras fueron, colocadas en frascos de plástico de la misma capacidad y se depositaron en la hielera para mantenerlas frescas y posteriormente trasladarlas al laboratorio, donde se fijaron con una solución de formaldehído al 4% (Méndez-Torres, 2016). De igual manera, en cada muestreo se registraron parámetros ambientales con un refractómetro ATC y un potenciómetro PCS test 35.

5.2.- Identificación de Especies con Potencial Tóxico

Con la finalidad de encontrar las especies productoras de las toxinas se tomó gota por gota del sedimentado de las muestras con una pipeta graduada, colocándolas

sobre un portaobjetos y después se colocó un cubreobjetos, se montó al microscopio y se inició la observación a 10x, 40x y 70x dependiendo de la estructura celular a observar. Este procedimiento se continuó hasta encontrar las especies productoras de toxinas.

5.3.- Determinación de toxinas

Para el análisis de toxinas presentes en los moluscos, estos se lavaron con agua potable retirando la arena o cualquier material extraño. A continuación, se separaron las valvas con cuidado para obtener la carne, sin lesionar el cuerpo del molusco y se colectaron aproximadamente 150 gr de carne y sobre un tamiz del número 10 se dejó escurrir durante 5 minutos. Se descartaron las conchas y se molió la carne en una mezcladora o licuadora para su homogenización, posteriormente se guardó en refrigeración hasta el momento del análisis.

5.3.1.- Determinación de Toxina Paralizante

5.3.1.1.- Bioensayo en ratón

Para la preparación de la solución de referencia de la toxina paralizante (1 µg de saxitoxina/ml) se ocupó un ml de solución estándar en un matraz volumétrico de 100 ml, se llevó al volumen deseado con agua destilada acidificada con HCL (pH=3). Esta solución permaneció estable guardada en refrigeración a 3 o 4°C y con un pH entre 2,0 y 4,0 basado en la NOM-242-SSA-2009 (D.O.F., 2009). En este procedimiento se utilizaron 40 ratones machos albinos, sanos y con un peso de 19 a 21 gr.

La muestra ya homogenizada se colocó en una balanza un vaso de precipitado con un agitador magnético y se registró el peso, se llevó la balanza a cero y se pesaron 100 gr de la carne homogenizada en el vaso de precipitado con el agitador al cual se le agregaron 100 ml de solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,18 N, posteriormente, se agitó la solución y se verificó el pH con un papel indicador, el pH se mantuvo entre 2 y 4, de preferencia 3. Si no era así se ajustaba el pH utilizando HCL 5 M con agitación constante.

Dentro de una campana de extracción se calentó la mezcla con agitación constante donde se utilizó un vidrio de reloj como tapadera para evitar evaporación. Entonces, se monitoreo la temperatura con un termómetro de líquido en vidrio y se contaron 5 minutos a partir del momento en el que se alcanzaron los 100°C.

Después, se realizó el ajuste de la mezcla, pesando el vaso de precipitado y se completó el peso inicial (peso del vaso con el agitador + 100 g de homogenizado + 100 ml HCL 0.18M) con HCL 0.001 M. En seguida se agitó para homogenizar y reposar hasta que una parte del sobrenadante fue translúcido y se encontró libre de partículas sólidas capaces de obstruir una aguja hipodérmica del 26. Inmediatamente se centrifugó el sobrenadante 5 minutos a 3000 rpm. Finalmente, se filtró la cantidad de líquido necesario para el bioensayo.

Al iniciar esta parte del proceso se pesaron 3 ratones, anotando el peso para cada organismo que fue analizado. A continuación se inyectó por vía intraperitoneal cada ratón con un ml de extracto centrifugado. Este es el punto crítico del bioensayo. Si

las inyecciones no se hacen directamente en la cavidad peritoneal el tiempo de muerte no es reproducible por lo que se verificó constantemente este dato.

Enseguida se activó el cronómetro en el momento de la inyección y se observó el organismo constantemente por 20 minutos. Posterior a ese tiempo se observó esporádicamente hasta los 60 minutos. A continuación, se registró el momento de la muerte de cada ratón. La mediana del tiempo de muerte con el extracto no diluido fue mayor de 7 minutos, el dato fue utilizado para determinar la toxicidad de la muestra. Al iniciar el uso de estándares se verificó el valor del Factor de Conversión (FC) del laboratorio previo al ensayo de las muestras.

De acuerdo al tiempo de muerte de cada ratón se determinaron las Unidades Ratón (UR) utilizando la tabla Sommer (Anexo 1). La UR de los ratones que sobrevivieron más de 60 minutos fue de <0.875. Posteriormente se corrigió el peso de cada ratón utilizando la tabla del Anexo 2.

Después, se calcularon las unidades de ratón (URC), multiplicando las UR por el factor de corrección del peso, se ordenaron las URC de menor a mayor para ubicar la mediana (MURC). La concentración de equivalentes de saxitoxina se calculó con la ecuación 1:

$$\mu\text{g PSP}/100\text{gr carne de molusco} = \text{MURC}/\text{ml} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200$$

En donde:

MURC= Mediana de las Unidades Ratón corregidas

FC = Factor de conversión

FD = Factor de dilución

200= corresponden a los 100g de muestra más 100g de HCL procesados

Cualquier mayor a 80 µg/100gr, es considerado valor de riesgo y de acuerdo a la NOM-242-SSA-2009 el molusco debe ser prohibido para consumo humano. Si todos los ratones sobreviven a la inyección más de 60 minutos, se reporta como concentración menor a (<) el valor obtenido de los cálculos de concentración de toxina.

5.3.1.2.- Pruebas rápidas Scotia Rapid Testing

Al abrir la prueba, se revisó la fecha de expiración y el color del desecante que contenía el paquete, si éste desecante es azul la prueba es utilizable, si es rosa se descarta y se abre una nueva prueba.

Se marcó con un plumón indeleble el identificador de la muestra bajo análisis sobre el extremo izquierdo del cartucho. Se dejó que el buffer de corrida alcanzara la temperatura ambiente.

El kit incluyó viales individuales con 400 µl de buffer, donde se añadieron 100 µl de extracto de molusco (hasta la línea negra marcada en el dispensador). Y antes de abrir el vial que contenía el buffer, se mantuvo en posición vertical con la tapa hacia arriba y se golpeó suavemente el vial sobre la mesa tres veces, con la intención de que todo su contenido se ubicara en la parte inferior del tubo, posteriormente se mezcló insertando la punta de la micropipeta en el líquido, aspirando y evacuando su contenido en 3 ocasiones. A continuación se tomaron 100 µl de la mezcla del

extracto/buffer y se colocaron en el pozo del cartucho identificado como “S”, se esperó entre 35 minutos y una hora para leer el resultado y por último se utilizó la guía “interpretación de resultados” que acompaña las pruebas para emitir el resultado.

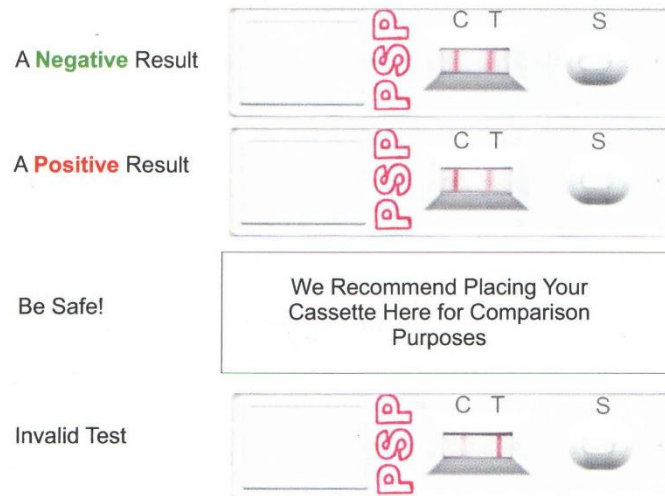


Figura 4.- Guía de interpretación de las pruebas rápidas.

Si la línea “T” es más oscura que la C del POSITIVO, la prueba es NEGATIVA.

Si la línea “T” es igual o más tenue que la C del POSITIVO, la prueba es POSITIVA.

Si hay dudas en la interpretación la prueba se considera POSITIVA

Si la línea “C” es igual o más tenue que la T el INVÁLIDO, la prueba es INVÁLIDA.

En este caso, la prueba debe repetirse asegurándose que el pH del extracto sea 3.

En caso de obtenerse el mismo resultado, el proveedor considera que la muestra contiene un agente desconocido que inhibe la reacción antígeno/anticuerpo; y debe emplearse un método de análisis alternativo.

5.3.2.- Determinación de Toxinas lipofílicas y ácido domoico

Inicialmente se pesaron 2.00 ± 0.05 g de tejido homogenizado en un tubo de centrifuga de 50 ml, se le agregaron 9.0 ml de metanol al 100% y se homogenizó con un vortex durante 3 minutos a máxima velocidad, posteriormente se centrifugaron a 2000 RPM durante 10 min a 20°C y el sobrenadante se transfirió a un matraz volumétrico de 20 ml. A continuación, se repitió la extracción sobre el pellet agregando otros 9.0 ml de metanol y se homogenizó la muestra por 1 minuto en un homogeneizador tipo Ultra Turrax™. Además se centrifugó nuevamente 10 min a 2000 y 20°C. Así mismo se transfirió y combinó el sobrenadante con el primer extracto y hasta completar el volumen a 20 ml con metanol al 100%. Finalmente se filtró una alícuota de este extracto a través de un filtro de 0.45 o 0.2 μm compatible con metanol y posteriormente se analizaron por cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

VII.-RESULTADOS

7.1.- Especies potencialmente toxicas

Durante la colecta de agua (julio- febrero 2019), fue posible obtener muestras de los tres sitios seleccionados en la laguna de Tampamachoco (Ver Figura 2), obteniendo un total de 30 muestras de agua que fueron revisadas bajo el microscopio, no fue posible observar bajo el microscopio los individuos pertenecientes a los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* en las muestras de agua de las Lagunas de Tampamachoco y Tamiahua.

6.2.- Determinación de toxinas

6.2.1.- Toxinas Paralizantes

6.2.1.1.- Bioensayo en ratón

Se analizó un total de cuatro muestras para la Laguna de Tampamachoco de los meses julio a octubre del organismo completo para el bioensayo en ratón donde la concentración que presentaron los ratones fue menor a 39.65 µg STX eq Kg⁻¹ tejido, no se obtuvieron valores máximos de 80 µg/100gr como establece la NOM 242 ya que todos los ratones sobrevivieron a la inyección de un ml del extracto de músculo de ostión y su tiempo de muerte fue mayor a una hora.

6.2.1.2.- Pruebas rápidas

En las pruebas rápidas de PSP test strip (Scotia Rapid Testing) para la presencia de la toxina paralizante en las 30 muestras del organismos completo en los meses

de julio-noviembre de las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua el resultado fue negativo (Figura 5).

Laguna de Tampamachoco

Laguna de Tamiahua

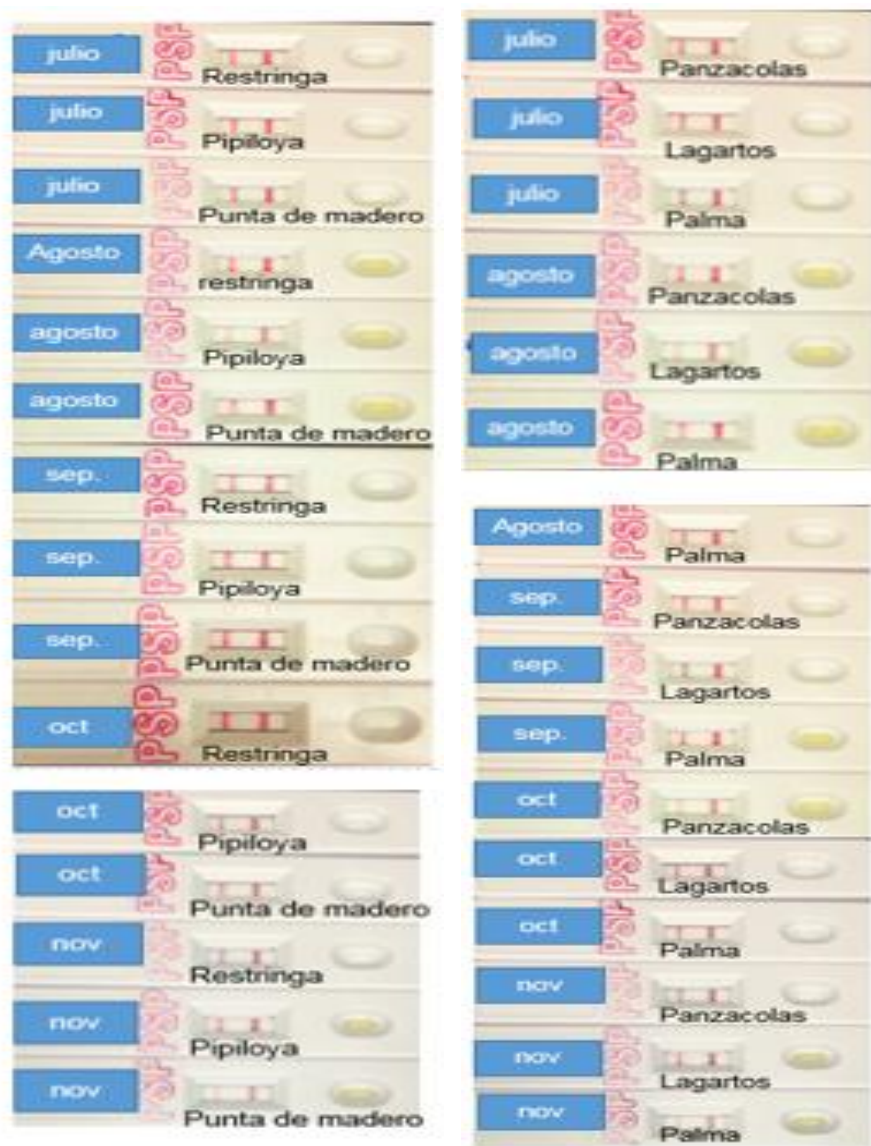


Figura 5.- Resultados negativos de la prueba rapida de PSP en 30 muestras de carne de ostión de las dos lagunas.

6.2.2.- Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Se analizaron muestras de cuerpo completo de ostión por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas donde se analizaron 24 muestras para la Laguna de Tampamachoco y 24 muestras para la Laguna de Tamiahua. Donde se obtuvieron las gimnodiminas, espirolidos, pectenotoxinas y ácido domoico.

6.2.2.1- Toxinas lipofílicas

Las gimnodiminas (GYM) fueron detectadas en todas las muestras de la laguna de Tampamachoco (Figura 6). La concentración más altas se detectaron en los meses diciembre a febrero con una concentración de 2.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 14.56 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

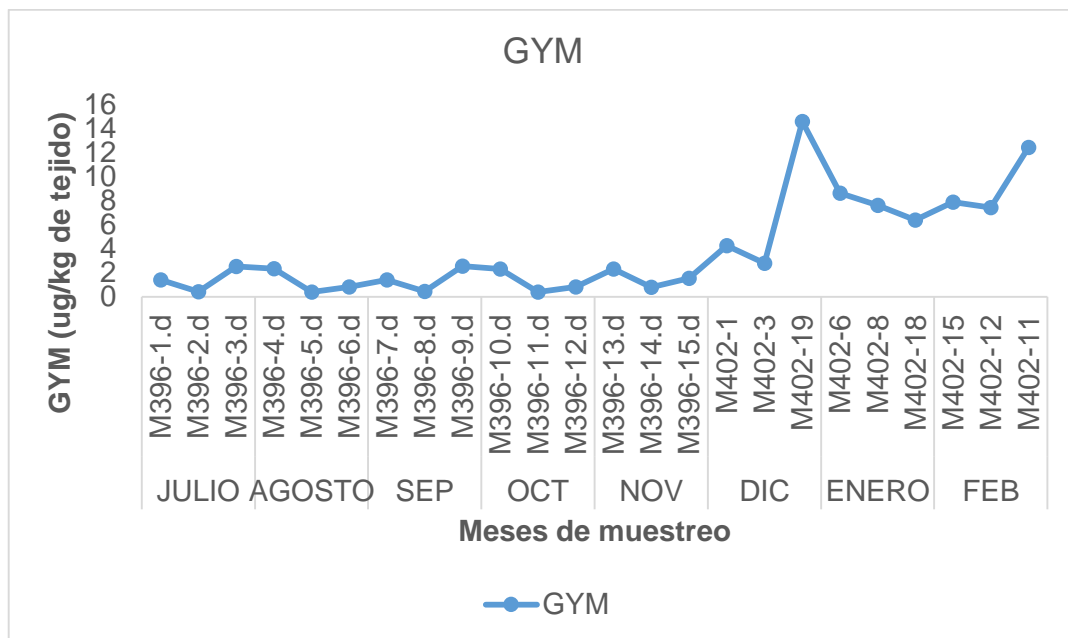


Figura 6.- Concentración de gimnodiminas en ostión (*C. virginica*) colectados en la laguna de Tampamachoco.

Los espirolidos (SPX1), se mostraron en mayores concentraciones en comparación con las gimnodiminas (GYM). Posteriormente, las concentraciones más altas se presentaron en los meses de julio a septiembre con valores de 2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 11.39 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 7).

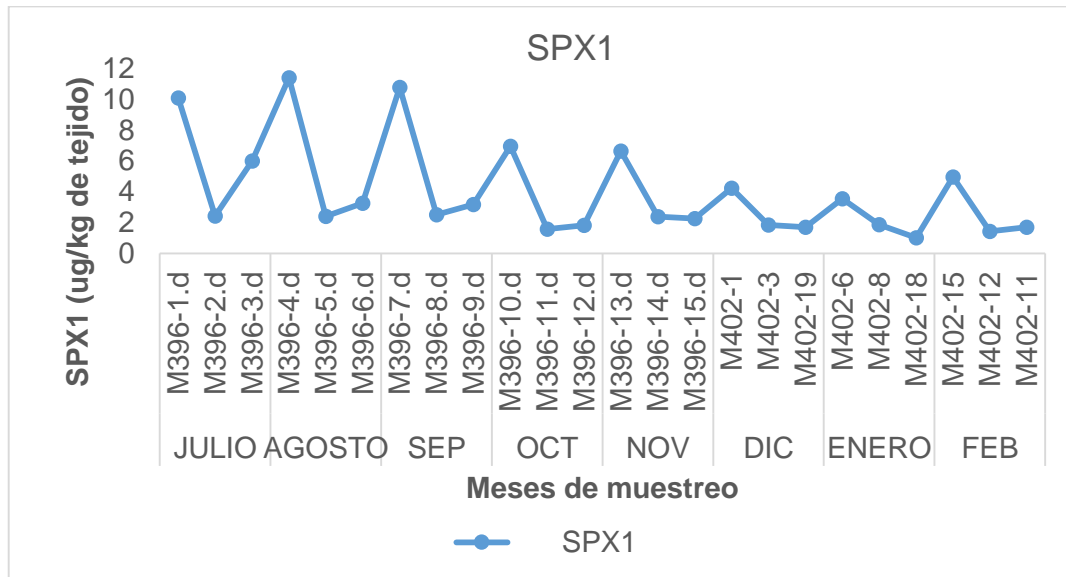


Figura 7.- Concentración de espirolidos en ostión (*C.virginica*) colectados en la laguna de Tampamachoco.

Las pectenotoxinas a diferencia de los espirolidos y gimnodiminas estas solo presentaron de diciembre a febrero (Figura 8) con concentraciones de 0.15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 0.38 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

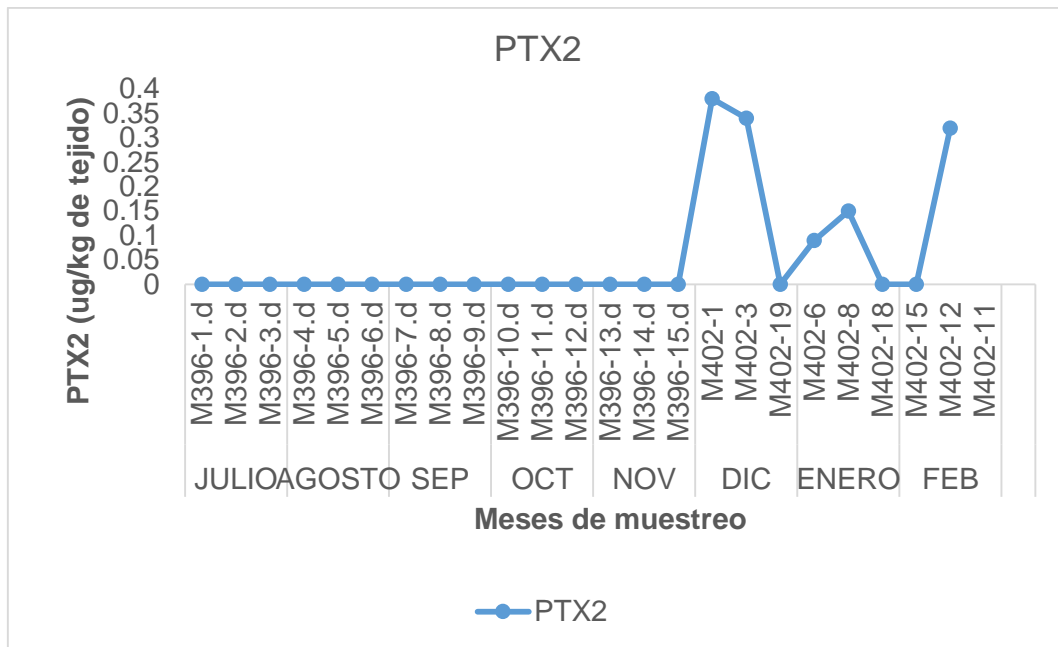


Figura 8.- Concentración de pectenotoxinas en ostión (*C.viginica*) en la laguna de Tampamachoco.

En la laguna de Tamiahua, las gimnodiminas se presentaron en la mayoría de las muestras analizadas (Figura 9). En los meses de agosto y noviembre con concentraciones de 4.28 µg kg⁻¹ y 4.82 µg kg⁻¹.

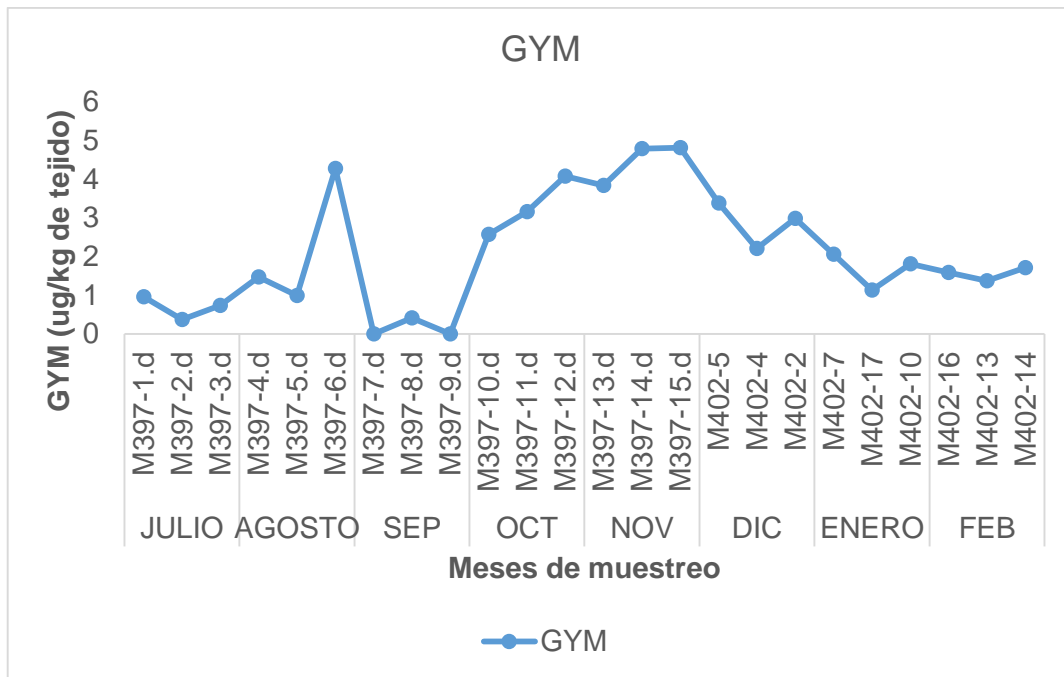


Figura 9.- Concentración de gimnodiminas en ostión (*C.viginica*) en la laguna de Tamiahua.

Los espirolidos se presentaron en todos los meses pero con bajas concentraciones a diferencia de las gimnodiminas (Figura 10). Los valores más altos fueron en los meses de septiembre con 1.76 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y octubre con 4.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

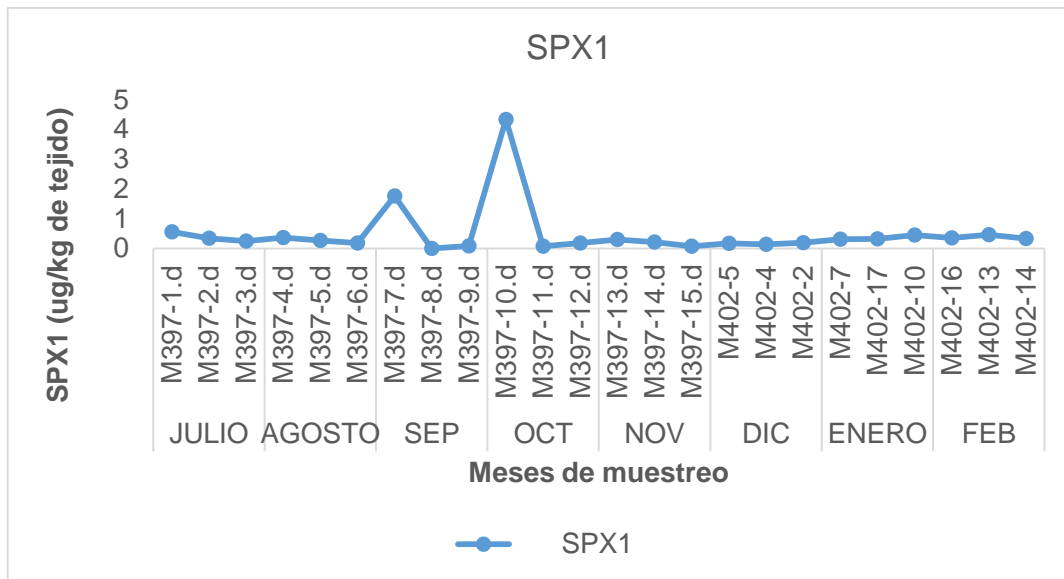


Figura 10.- Concentración de espirolidos en ostión (*C.viginica*) en la laguna de Tamiahua.

Las pectenotoxinas a diferencia de las gimnodiminas y los espirolidos estas solo se presentaron en tres meses (Figura 11), con concentraciones de 0.13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 2.87 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

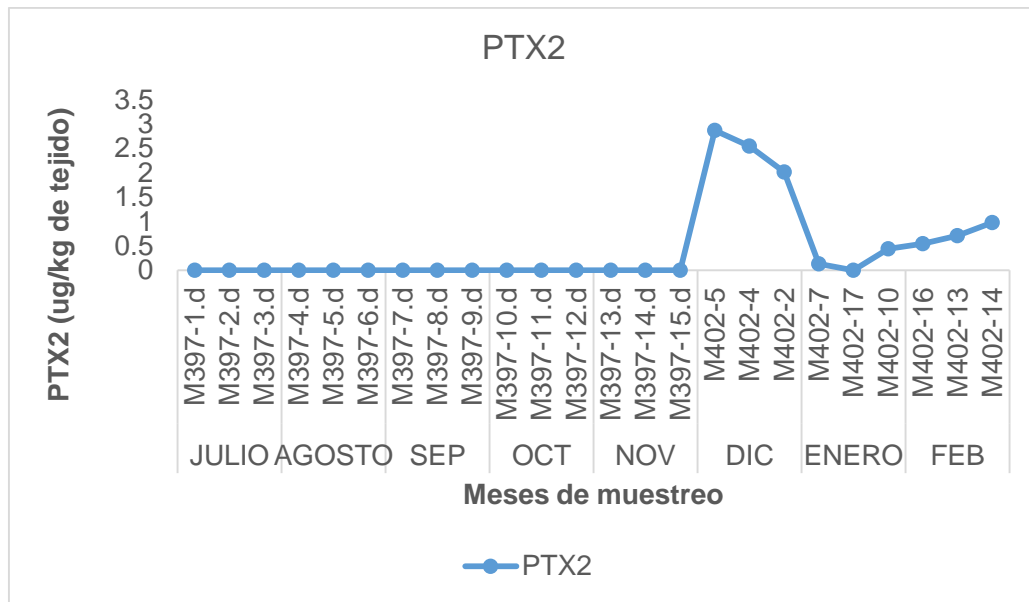


Figura 11.- Concentración de pectenotoxinas en ostión (*C. virginica*) en la laguna de Tamiahua.

El ácido domoico solo se presentó en la laguna de Tamiahua (Figura 12) en los meses de agosto a noviembre con concentraciones que van de 1.63 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 14.45 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

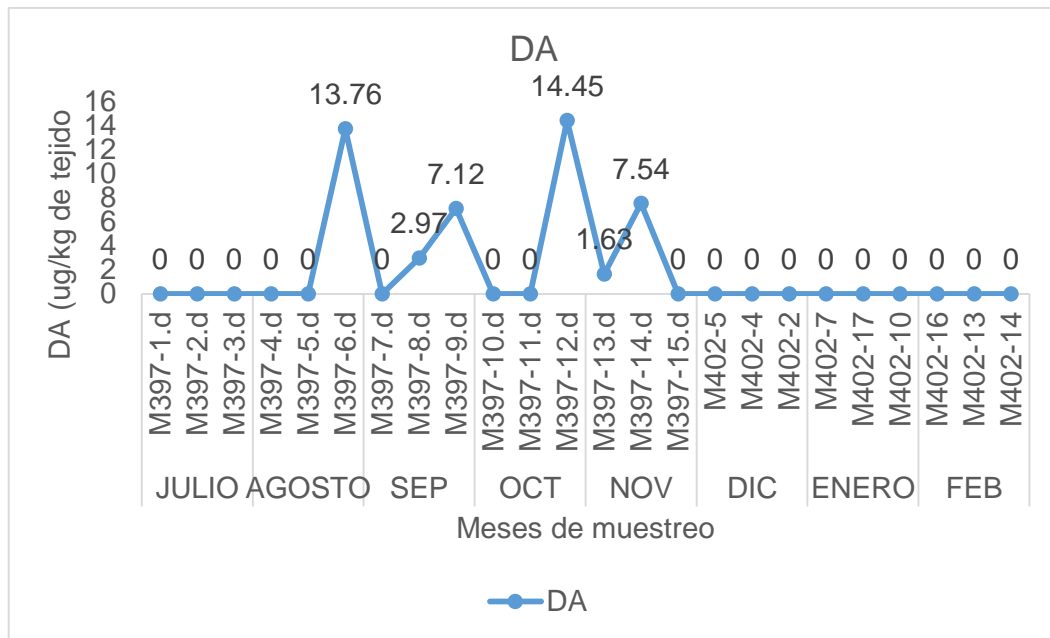


Figura 12.- Concentración de ácido domoico en ostión (*C.viginica*) en la laguna de Tamiahua.

VIII.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación no fue posible encontrar los géneros productores de biotoxinas marinas en la laguna de Tampamachoco lo que difiere de los trabajos de Orduña-Medrano (2012) donde reportó la presencia de *Alexandrium* en marzo y abril y *Gymnodinium* en febrero y mayo. Mientras Pérez-Olmedo (2017) obtuvo en sus muestras a *Gymnodinium* en el mes de julio y *Alexandrium* en junio, julio, agosto, septiembre y diciembre coincidiendo con algunos meses de muestreo del presente trabajo y se utilizó la misma metodología para la tomas de muestras tanto superficiales como de arrastre, realizando la misma fijación, pero en diferentes sitios de muestreo.

Es necesario dar a conocer que se realizó la observación de las muestras de agua tanto superficiales como de arrastre por medio de microscopía óptica por el mismo observador durante toda la fase del estudio. Donde los dinoflagelados productores de toxinas no fueron encontrados en las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua. Para cumplir con el objetivo de observar las especies potencialmente toxicas se requería el empleo de microscopía de barrido para poder observar a detalle las especies de fitoplancton presentes (Poot-Delgado *et al.*, 2015). Otra afectación podría ser la depredación ya que tiene un efecto directo en la comunidad fitoplanctónica (Rodríguez, 2008).

Las tasas de absorción y eliminación de las toxinas se pueden ver afectadas por la temperatura y el pH de agua de mar, los cuales influyen en el crecimiento del fitoplancton y la capacidad del molusco para acumular las toxinas (Webb *et al.*,

2013). Los niveles de toxicidad oscilan entre las especies de bivalvos, debido a las diferencias en los componentes de la toxina retenidos y la tasa de depuración, ya que algunas especies depuran toxinas rápidamente, mientras que otras demoran en desintoxicarse (Deeds *et al.*, 2008).

En el estudio del músculo de ostión de *Crassostrea virginica* a través del bioensayo en ratón no se obtuvieron resultados positivos y no rebasaron los límites permisibles de 80 µg de STX ya que los tiempos de muerte fueron mayores a una hora en comparación lo encontrado por Ortiz-Castro, (2013) en donde reporta concentraciones elevadas de dicha toxina que fluctúan entre 163 a 292 µg STX eq/100 g de tejidos de *Choromytilus chorus* de bancos naturales, mientras que Seguel y Sfeir, (2010) reportan concentraciones bajas de 30 µg STX eq 100 g⁻¹ y el límite más alto 96 µg STX eq. 100 g⁻¹ y estos utilizaron la misma técnica del bioensayo en ratón y encontraron concentraciones elevadas de la toxina paralizante esto se debe al método de muestreo, el área de estudio y las variables ambientales, en algunas ocasiones no es necesaria una proliferación masiva de las especies para que estas representen un peligro real para la salud humana. De las 2,000 especies conocidas de dinoflagelados aproximadamente 60 especies producen potentes toxinas citolíticas, hepatotóxicas o neurotóxicas (Gómez *et al.*, 2011).

Otro punto a considerar es el tamaño y la especie del bivalvo estudiado ya que de estos factores dependen las tasas de filtración de alimento, la cual afecta su capacidad de acumular y biotransformar toxinas (Wu *et al.*, 2015) y en el presente estudio no se cuenta con este dato, solo se pesaron los gramos necesarios para los bioensayos pero años anteriores Vidal-Briseño *et al.*, 2015 reportó para la laguna de Tampamachoco una talla promedio de 57.18 cm y para la laguna de Tamiahua fue de 53.57 cm.

El bioensayo en ratón presenta diversos inconvenientes, como la necesidad de mantener una colonia de ratones, la variabilidad del resultado en función de la especie de ratón, el peso que se necesita, la cantidad de tiempo consumido para llevar a cabo el bioensayo y la cantidad de sacrificios de animales que implica y unas de las ventajas del bioensayo en ratón es que garantiza la seguridad del alimento, puesto que se pueden detectar nuevas toxinas y análogos, por lo que es el método más utilizado para los programas de monitorización y protección de la salud de los consumidores (Alfonso-Méndez, 2008). El bioensayo en ratón reporta poca información sobre el perfil de toxinas, pero es capaz de informar sobre la toxicidad total de la muestra del tejido de ostión utilizada y todo esto sumado a las presiones éticas sobre el uso de animales en investigación ha logrado que se planteen métodos analíticos alternativos (Hartung, 2010).

Las pruebas rápidas ligadas a enzimas (ELISA) son un tipo de ensayo bioquímico que utiliza anticuerpos generados por el analito de interés, y la detección se manifiesta con un cambio de color en la prueba, se ha avanzado con una gama de

ensayos para la saxitoxina y varios de sus análogos que utilizan formatos directos e indirectos, con anticuerpos policlonales y monoclonales (Cusick y Sayler, 2013).

La técnica ELISA ha sido bien desarrollada a lo largo de los años, y están disponibles varios kits comerciales que ofrecen importantes ventajas, como su fácil uso, su alto rendimiento y se ha descubierto una correlación entre ELISA y el bioensayo en ratón en algunos estudios, como ya se ha expuesto, el perfil de toxinas puede llegar a ser complejo, por lo que una de las preocupaciones con esta técnica es la reactividad cruzada dentro de los diferentes derivados, que se da cuando un mismo anticuerpo es capaz de reconocer distintos analitos presentes en la muestra (Rey-López, 2017). El número de falsos positivos encontrados con las pruebas rápidas es muy elevado, Debido a estas desventajas, se recomienda que los métodos ELISA se utilicen como herramientas de detección en lugar de ensayos de cuantificación (Humpage *et al.*, 2010). Con esta técnica los resultados fueron negativos para ambas lagunas, es un método rápido pero con estas pruebas no se puede saber la cantidad de toxina que se encuentra en el músculo de ostión, solo indica si está presente o no.

En la unión Europea, el método de referencia para la detección de toxinas lipofílicas es el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC MS/MS), esta técnica debe ser aplicada como método de referencia y se utiliza en análisis rutinarios puesto que su ventaja es que los métodos LC-MS/MS son métodos confirmatorios (Rey-López, 2017).

Se detectaron en el ostión *C. virginica* diferentes toxinas de tipo lipofílico por medio de cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas para la laguna de Tampamachoco; se encontraron espirolidos los cuales son producidos , gimnodiminas y pectenotoxinas, mientras que para la laguna de Tamihua se encontraron los espirolidos, gimnodiminas y pectenotoxinas y el ácido domóico. Se detectaron a los espirolidos, gimnodiminas y ácido domóico en general las concentraciones de estas toxinas fueron bajas, las cuales no alcanzaron las concentraciones indicadas en la NOM 059 y no se observó presencia de las especies productoras durante el periodo de muestreo.

Los espirolidos y las gimnodiminas son producidos por el dinoflagelado *Alexandrium ostentfeldii* (Wiese *et al.*, 2010), esta especie no fue posible encontrarla en las muestras de agua, pero las toxinas estuvieron presente en ambas lagunas. Esta especie productora de la toxina no se ha reportado en ninguna laguna, solo se encontró la especie *Alexandrium compressum* y el género *Alexandrium* en los meses de marzo y abril (Orduña-Medrano, 2012. Mientras que. Pérez-Olmedo, 2017 reporto quistes *Alexandrium* en los meses de junio a septiembre.

Las Pectenotoxinas son producidas por dinoflagelados de diferentes especies. *Dinophysis fortii*, *D. acuminata* (Mackenzie *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007), *D. acuta* (Suzuki *et al.*, 2003) y *D. caudata* (Fernández *et al.*, 2006). Esta toxina fue en contratada en ambas lagunas en los meses de diciembre a febrero y para Tampamachoco se ha reportado *D. caudata* por Orduña-Medrano, 2012 en los meses de febrero a diciembre, y por Pérez-Olmedo, 2017 de enero a septiembre y

reportando a *D. acuminata* en marzo, junio y agosto. Para la laguna de Tamiahua solo ha sido reportada *D. caudata* en los meses de mayo, noviembre 1996, marzo mayo y octubre 1997 (Figueroa-Torres y Weiss-Martínez, 1999)

El ácido domoico solo se presentó en la laguna de Tamiahua en los meses de agosto a noviembre esta toxina es producida por el género *Pseudo-nitzschia* (Trainer, *et al.*, 2012), este género no ha sido reportada para la laguna de Tamiahua y no se encontró en las muestras de agua recolectadas.

Este estudio constituye hasta ahora el primer reporte para la detección en músculo de ostión *Crassostrea virginica* la presencia de biotoxinas marinas para el Golfo de México aunque los niveles que se encontraron en el músculo de ostión son relativamente bajas, no se puede excluir la posibilidad de un aumento de sus concentraciones en el futuro.

IX.- CONCLUSIONES

El presente estudio no se encontraron las especies potencialmente tóxicas en las muestras de agua estudiadas a través de las técnicas de microscopía óptica.

En ambas metodologías utilizadas para la detección de toxinas paralizantes arrojaron resultados negativos

Mediante LC-MC/MC se detectaron tres grupos de toxinas lipofílicas: espirolidos, gimnodiminas, pectenotoxinas y ácido domoico.

Al observar los resultados del presente estudio con respecto a la NOM-242-SSA1, los valores obtenidos de las biotoxinas marinas fueron menores a los valores máximos permisibles establecidos.

Sin embargo, es importante tener en cuenta la existencia de estos compuestos en las lagunas de Tampamachoco y Tamiahua, dada la presencia de la toxina amnésica en moluscos (ácido domoico), el cual se registra como el primer reporte de esta sustancia en estas latitudes. Así como la presencia de pectenotoxinas, los espirolidos y las gimnodiminas de los cuales no se han realizado estudios para conocer su toxicidad para los humanos. Sin embargo, este hallazgo debe estudiarse cuidadosamente en futuras investigaciones, que estarán directamente relacionadas con la disponibilidad de los estándares de referencia de toxinas.

X.- APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

En la ostricultura, es ideal tener un buen manejo del recurso pesquero y planes de vigilancia sanitaria. Sin embargo, esto no puede ser factible sin antes realizar un diagnóstico del estado de los bancos de extracción de ostión especialmente con respecto a las biotoxinas marinas que son transmisibles a humanos. En este sentido, los monitoreos ambientales son una herramienta de diagnóstico y obtención de información que nos permite, entre otras cosas, conocer el estado del recurso, la presencia y prevalencia de las biotoxinas marinas en *C. virginica*.

Con respecto a la producción del ostión se debe conocer el estado de la población así como las artes de pesca que son utilizadas para su extracción. Es importante realizar estudios que lleven a relacionar la presencia de biotoxinas marinas en la zona de extracción utilizando los métodos analíticos para desarrollar en nuestro país líneas de investigación para el estudio de las biotoxinas marinas, desde el punto de vista biológico, bioquímico y oceanográfico para evaluar los factores que afectan la calidad sanitaria y por ende a los consumidores.

El presente estudio aporta información acerca de la presencia o ausencia de las biotoxinas marinas en los bancos ostrícolas de Tamiahua y Tampamachoco, estos datos pueden ser utilizados para promover la adopción de medidas dirigidas a la disminución de estas toxinas en los ostiones tales como: un monitoreo permanente de las toxinas en los bancos ostrícolas y sitios de venta a través de técnicas

sensibles y específicas. Lo anterior es debido a que en la zona costera de Veracruz el diagnóstico de estas toxinas es incipiente y no se cuentan con laboratorios certificados para el diagnóstico de estas sustancias y que se pueda evitar la presencia de toxinas en ostiones destinados al consumo humano.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

Abi-Khalil, C., Finkelstein, D.S Conejero, G., Du-Bois, J Destoumieux-Garzon, D y Luc-Rolland, J.L. 2017. The paralytic shellfish toxin, saxitoxin, enters the cytoplasm and induces apoptosis of oyster immune cells through a caspase-dependent pathway. *Aquatic Toxicology*, 190,133-141.

Alfonso-Méndez, M.C. 2008. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Tesis doctoral. Universidad de Santiago Compostela. 141p.

Almazán-Becerril, A. 2000. Estudio taxonómico de algunos dinoflagelados potencialmente tóxicos en el Caribe Mexicano. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, México DF.75p.

Almazán-Becerril, A., Rosiles-González, G., Escobar-Morales, S., Rodríguez-Palacios M y Hernández-Becerril, D.U. 2012. Dinoflagelados bentónicos del Arrecife Mesoamericano: Caribe Mexicano. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Unidad de Ciencias del Agua. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto No. HJ033 México D. F.

Alonso-Rodríguez, R., Mendoza-Amézquita, E., Velásquez-López, S.A., Seim, J y Martínez-Rodríguez, V.M. 2015. Floraciones algales nocivas producidas por *Pyrodinium bahamense* en Oaxaca, México (2009-2010). *Salud pública de México*, 57(4), 343-351.

Anderson, D.M. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean and coastal management*, 52(7), 342-347.

Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., y Montresor, M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10-35.

Arias, L.C. 2014. La pesquería mexicana del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) del Golfo de México: limitantes de su desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad Veracruzana. Boca del Río, Veracruz.

Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D. J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E. J y Hernández-Sandoval, F. E. 2010. Ecological and

physiological studies of *Gynodinium catenatum* in the Mexican Pacific; A review. *Marine Drugs*, 8(6), 1935-1961.

Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J. Núñez- Vázquez, E y Hernández- Sandoval, F.E. 2011. El estado actual del estudio de floraciones algales nocivas en México. *Hidrobiológica*, 21(3), 381-413.

Barón-Campis, S.A., Okolodkov, Y.B., Ríos-Lara, G.V., Vázquez-Gómez, N., Rubio-Sánchez, V., Arce-Rocha, G., González-López, W.A y Núñez-Vázquez, E.J. 2014. Dinoflagelados nocivos y ciguatoxinas en la costa norte de Yucatán: un riesgo para el futuro desarrollo de la maricultura. XXI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, Isla Cozumel, Quintana Roo, México.

Bates, S. S. 2000. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added *Journal of Phycology*, 36(6), 978-983.

Bates, S.S., Garrison, D.L y Horner, R.A. 1998. Bloom dynamics and physiology producing *Pseudo-nitzschia* species. En: Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G.M. Eds. *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag. Heidelberg. 267-292 pp.

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

Botana, L. 2014. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, physiology and detection*. 3th ed New York, CRC Press Taylor and Francis Group, 773 p.

Braga, A.C., Camacho, C., Marques, A., Gago-Martínez, A., Pacheco, M y Costa, P.R. 2018. Combined effects of warming and acidification on accumulation and elimination dynamics of paralytic shellfish toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Research*, 164, 647-654.

Cáceres-Martínez, J., y Vázquez-Yeomans, R. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia Pesquera*, 21, 5-48.

Cao, J., Zheng, J., Yu, B., Wang, Q., Xu, J y Li, A. 2011 Evaluation of mouse bioassay results in an inter-laboratory comparison for paralytic shellfish poisoning toxins. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(4), 912-916.

Contreras, F y Castañeda, O. 2004. Las lagunas costeras y estuarios del Golfo de México: Hacia el establecimiento de índices ecológicos. *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 373-416.

Cruz, M.G., Ferreira, N.S., Gomes, M.T.S., Botelho, M.J., Costa, S.T., Vale, C y Rudnitskaya, A. 2018. Determination of paralytic shellfish toxins using potentiometric electronic tongue. *Sensors and Actuators. B Chemical*, 263, 550-556.

Cusick, K., y Sayler, G. 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions *Marine drugs*, 11(4), 991-1018.

Deeds, J., Landsberg, J., Etheridge, S., Pitcher, G y Longan, S. 2008. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine drugs*, 6(2), 308-348.

Esqueda-Lara, K., de Jesús Sánchez, A., Valdés-Lagunes, G., Salcedo, M.A Franco-Torres, A. E y Florido, R. 2016. Fitoplancton en el humedal tropical Chaschoc en la cuenca baja del río Usumacinta. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(4), 1177–1188.

Fabro, E., Almandoz, G. O., Ferrario, M. E., Hoffmeyer, M. S., Pettigrosso, R. E., Uibrig, R., Krock, B. 2015. Co-occurrence of *Dinophysis* tripos and pectenotoxins in Argentinean shelf waters. *Harmful Algae*, 42, 25-33.

Figuroa-Torres M.G y Weiss-Martínez I. 1999 Dinoflagelados (Dinophyceae) de la Laguna de Tamiahua Veracruz, México. *Revista de biología tropical*, 43-46.

Fernández, M.L., Reguera, B., González-Gil, S., Míguez, A. 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain). *Toxicon*, 48, 477-490.

Ferreira, N.S., Cruz, M.G., Gomes, M.T.S y Rudnitskaya, A. 2018. Potentiometric chemical sensors for the detection of paralytic shellfish toxins. *Talanta*, 181, 380-384.

García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A y Núñez-Vázquez, E. J. 2016. Florecimientos Algales Nocivos en México. Ensenada, México. CICESE. 438 p.

Gerssen, A., Pol-Hofstad, I.E., Poelman, M., Mulder P.J., Van der Top, H.J y De Boer, J. 2010. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins*, 2(4), 878-904.

Gómez, F., Moreira, D y López-García, P. 2011. Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. *Hidrobiológica.*, 21 (3), 343-364.

Hartung, T. 2010. Análisis comparativo de la Directiva revisada 2010/6106 / UE para la protección de animales de laboratorio con su predecesora 86/609 / EEEEC un informe t4.ALTEX-Alternativas a la experimentación animal, 27 (4), 285-303.

Hernández, C.J.E. 2017. Dinoflagelados y toxinas lipofílicas en bancos naturales de bivalvos al sur de la Bahía de la Paz, B.C.S., México. Tesis maestría. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B.C.S. 118p.

Hernández-Becerril, D. U y Almazán-Becerril, A. 2004. Especies de dinoflagelados del género *Gambierdiscus* (Dinophyceae) del Mar Caribe Mexicano. *Revista de Biología tropical*, 77-87.

Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J., Band-Schmidt, C.J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez E. y Bustillos-Guzmán, J.J. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica*, 19(3), 245-256.

Hoppenrath, M., Murray, S.A., Chomérat, N y Horiguchi, T. 2014. Marine benthic dinoflagellates- Unveiling Their Worldwide Biodiversity. *Kleine Senckenberg Reihe*, Band 54, Schweizerbart, Stuttgart, Germany, 276 p.

Hu, T., Curtis, J. M., Walter, J. A y Wright, J. L. 1996. Characterization of biologically inactive spirolides E and F: Identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Letters*, 37(43), 7671-7674.

Humpage, A. R., Magalhaes, V. F., y Froschio, S. M. 2010. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(5), 1655-1671.

INEGI. 2001. Tuxpan. Estado de Veracruz. Cuaderno Estadístico Municipal. Gobierno del Estado de Veracruz e Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México. 180 p.

Kong, K., Moussa Z., Lee, C y Romo D. 2011. Total synthesis of the spirocyclic imine marine toxin (–) Gymnodimine and unnatural C4-epimer. *National Institute of Health*, 133(49), 19844-19856.

Lirdwitayaprasit, T., Kotaki, Y., Takata, Y., Ha, D. V., Kamolsiripichaiporn, S., Kodama, M., Sato, S. 2009. Occurrence of domoic acid in tropical bivalves. *Fisheries Science*, 75(2), 473-480.

Liu, Y., Yu, R.C., Kong, F.Z., Chen, Z.F., Dai, L., Gao y Zhou, M.J. 2017. Paralytic shellfish toxins in phytoplankton and shellfish samples collected from the Bohai Sea., *China Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 324-331.

López- Cuevas, A. 2013. Efecto de la exposición de juveniles del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg. 1793) a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. S.C. La Paz, Baja California Sur.

López-Portillo, J. A. 2012. Programa regional para la caracterización y el monitoreo de ecosistemas de manglar del Golfo de México y Caribe mexicano: inicio de una

red multi-institucional. Instituto de Ecología A.C. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. FN007. México D. F.

Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. Harmful Algae, 4, 75-85.

Mancera-Pineda, J.E., Montalvo-Talaigua, M y Gavio, B. 2014. Dinoflagelados potencialmente tóxicos asociados a material orgánico flotante (DRIFT) en San Andrés isla, Reserva Internacional de la Biosfera- Seaflower. Caldasia 36(1):139-156.

Marín, T.G., Aguirre, A.C.R., Cruz, E.N.S., Falcón, H.M y Gordillo, L.R.D. 2013. Intoxicación parálitica por ingesta de moluscos. Reporte de caso. Análisis Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC, 58(3), 192-195.

Méndez-Torres, J. 2016. Taxonomía y abundancia del género *Pseudo-nitzschia* en la zona costera de Tuxpan, Veracruz. Tesis de Licenciatura Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 55p.

Mier, J., Castro-Georgana, V., Mayor-Nucamendi, H.F., Brito-López, J.A. 2006. Floraciones algales en Tabasco. Salud en Tabasco, 12(1), 414-422.

Mexicana, N.O 2011. Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca. frescos-refrigerados, congelados y procesados especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación.

Núñez-Vázquez, E., Poot-Delgado, C.A., Yotsu-Yamachita, M., Domínguez-Solís, G., Hernández-Sandoval, F.E y Busillos-Guzmán, J. J. 2013 Toxicidad de los botetes silvestres *Sphoeroides* spp., y *Lagocephalus* spp., de las costas de Campeche, México. Memorias del XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Los Cabos, B. C. S.

Orduña-Medrano, R. E. 2012. Patrones de distribución y abundancia del fitoplancton nocivo en la zona costera de Tuxpan Veracruz. Tesis Maestría. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz.190p.

Ortiz-Castro, A. F. 2013. Respuesta fisiológica y dinámica de intoxicaciones/detoxicación de dos poblaciones del bivalvo *Choromytilus chorus* con diferente historial de exposición al veneno paralizante de moluscos (VPM). Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. 46p.

Otero, J. J. G. 2003. Aspectos epidemiológicos de la intoxicación por toxina diarreica de los moluscos (DSP). In Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia (69)4, 170-201.

Otero, A., Chapela, M.J., Atanassoya, M., Vieites, J.M y Cabado, A.G. 2011. Cyclic imines: chemistry and mechanism of action: A review. Chemical Research in Toxicology, (24)11, 1817-1829.

Parra-Toriz, D., Ramírez-Rodríguez, M.D.L.A y Hernández-Becerril, D.U. 2011. Dinoflagelados (Dinophyta) de los órdenes Prorocentrales y Dinophysiales del Sistema Arrecifal Veracruzano, México. Revista de Biología Tropical, 59 (1), 501-514.

Pérez-Olmedo L. 2014. Riqueza y abundancia de dinoflagelados (Dinophyta) en los arrecifes Tuxpan y Enmedio en la temporada de lluvias 2013, Tuxpan, Veracruz. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 101 p.

Pérez-Olmedo L.2017. Composición y abundancia de especies tóxicas y nocivas de dinoflagelados causantes de mareas rojas en la zona costera de Tuxpan, Veracruz. Tesis de maestría. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz 89p.

Pizarro, G., Garrido, C., Cárdenas, C., Frangólopulos, M., Alarcón, C., Guzmán, L y Pacheco, H., 2011. Distribución espacial de *Alexandrium catenella* y de toxinas paralizantes en el plancton y mariscos entre el Golfo de Penas y canal de Trinidad (primavera 2008). Ciencia y Tecnología del Mar, 34(1-2), 19-30.

Poot-Delgado, C. A., Okolodkov, Y.B., Castillo, J.A.A y Von Osten, J.R. 2015. Annual cycle of phytoplankton with emphasis on potentially harmful species in oyster beds of Términos Lagoon, southeastern Gulf of Mexico. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 50(3), 465-477.

Pulido, O. 2011. Cyclic imines (gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins proro-centrolide and spiro-proro-centrimine) FAO fisheries and aquaculture technical paper, 551 en: Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L. 2011. Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551. Rome, FAO 337 pp.

Reguero, M., García-Cubas, A y Zúñiga, G. 1991. Moluscos de la Laguna de Tampamachoco, Veracruz, México: Sistemática y ecología. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 18 (2), 289-328.

Rey-López, V. 2017. Mejora e innovación en los procedimientos de detección y cuantificación de los métodos de análisis de toxinas PSP. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 141p.

Rodríguez, P. L. 2008. Estructura y producción primaria del fitoplancton y perifiton en un humedal del bajo Paraná. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 264 p.

Sánchez-Bravo, Y.A., García-Mendoza, E., Blanco, J., Paredes-Banda, P.E., Medina-Elizalde, J. 2016. Ficotoxinas en la costa occidental de la península de Baja California. En: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez, E. J. 2016. Florecimientos Algales Nocivos en México. Ensenada, México. CICESE. 438 p

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

Seki, T., Satake, M., Mackenzie L., Kaspar H.F y Yasumoto, T. 1995. Gymnodimine, una nueva toxina marina de estructura sin precedentes aislada de las ostras de Nueva Zelanda y el dinoflagelado, *Gymnodinium* sp. Tetrahedron Letters, 36 (39), 7093-7096.

Schollin, C. A., Gulland. F., Doucette, G. J., Benson, S., Busman, M F., Chavez, P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L. J., Marin, R., Miller, P.E., McLellan, W. A., Moeller, P.D. R., Powell, C. L., Roewles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T.,

Trainer, V y Van Dolah F. M. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403, 80-84.

Shin, C., Jang, H., Jo, H., Kim, H. J., Kim, D. S y Hong, J. H. 2017. Development and validation of an accurate and sensitive LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish and tunicate. *Food Control*, 77, 171-178.

Shin, C., Jo, H., Kim, S.H y Kang, G.J. 2018. Exposure assessment to paralytic shellfish toxins through the shellfish consumption in Korea. *Food Research international*, 108, 274-279.

Stirling, D. J. 2001 Survey of historical New Zealand shellfish samples for accumulation of gymnodimine, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35(4), 851-857.

Sunesen, I., Lavigne, A.S., Goya, A y Sar, E, A. 2014. Episodios de toxicidad en moluscos de aguas marinas costeras de la provincia de Buenas Aires (Argentina) asociados a algas tóxicas (Marzo de 2008-Marzo de 2013). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49(3), 327-339.

Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M.A. 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography*, 992, 141-150.

Trainer, V., Bates, S.S y Lundholm, N. 2012 *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14, 271-300.

Trainer, V. L., Adams, N. G., Bill, B. D., Stehr, C. M., Wekell, J. C., Moeller, P y Woodruff, D. 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnology and oceanography*, 45(8), 1818-1833.

Vidal-Briseño, C. I., Hernández-Herrera, R. I., Galindo-Cortés, G y Martín-del Ángel, S. 2015. Estructura poblacional de la captura del ostión *Crassostrea virginica* en las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz, México. *Hidrobiológica*, 25(2), 265-273.

Vicente, E., De Hoyos, C., Sánchez, P y Cambra, J. 2005. Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la directiva MARCO del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton. Confederación Hidrográfica del Ebro. 36 p.

Webb, J.L., Vandendor, J., Pirie, B., Robinson, S.M.C., Cross, S.F., Jones, S.R.M y Pearce, C.M. 2013. Effects of temperature, diet, and bivalve size on the ingestion of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) larvae by various filter-feeding shellfish. *Aquaculture*, 406, 9-17.

Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C y Neilan, B.A. 2010. Neurotoxin Alkaloids: Saxitoxin and its Analogs. *Marine Drugs*, 8(7), 2185-2211.

Wright, J.L.C., Boyd, R.K., Freitas, A.D., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson. W.D y Pathak., V.P. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of. Chemistry*, 67(3), 481-490.

Wu, H., Yao, J., Guo, M., Tan, Z., Zhou, D y Zhai Y. 2015. Distribution of marine lipophilic toxins in shellfish products collected from the Chinese market. *Marine Drugs*, 13(7), 4281-4295.

XIV.- ANEXO

Cuadro 1.- Tabla de Sommer que muestra la relación del tiempo de muerte: unidad de ratón para las toxinas paráliticas de moluscos (PSP).

Tiempo muerte	Unidades ratón	Tiempo muerte	Unidades ratón
1:00	100	5:00	1.92
10	66.2	05	1.89
15	38.3	10	1.86
20	26.4	15	1.83
25	20.7	20	1.80
30	16.5	30	1.74
35	13.9	40	1.69
40	11.9	45	1.67
45	10.4	50	1.64
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.60
		15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.39
20	5.66	15	1.35
25	5.32	30	1.31
30	5.00	45	1.28
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.25
45	4.26	15	1.22
50	4.06	30	1.20
55	3.88	45	1.18
3:00	3.70	9:00	1.16
05	3.57	30	1.13
10	3.43	10:00	1.11
15	3.31	30	1.09
20	3.19		
25	3.08	11:00	1.075
30	2.98	30	1.06
35	2.88		
40	2.79	12:00	1.05
45	2.71	13	1.03
50	2.63	14	1.015
55	2.56	15	1.000
		16	0.99
4:00	2.50	17	0.98
05	2.44	18	0.972
10	2.38	19	0.965
15	2.32	20	0.96
20	2.26	21	0.954
25	2.21	22	0.948
30	2.16	23	0.942
35	2.12	24	0.937
40	2.08	25	0.934
45	2.04	30	0.917
50	2.00	40	0.898
55	1.96	60	0.875

Cuadro 2. Tabla de corrección de pesos para la cuantificación de PSP por bioensayo en ratón (NOM 059)

Pesos	UR	Pesos	UR	Pesos	UR
17.0	0.88	19.0	0.97	21.0	1.03
17.1	0.885	19.1	0.973	21.1	1.032
17.2	0.89	19.2	0.976	21.2	1.034
17.3	0.895	19.3	0.979	21.3	1.036
17.4	0.90	19.4	0.982	21.4	1.038
17.5	0.905	19.5	0.985	21.5	1.04
17.6	0.91	19.6	0.988	21.6	1.042
17.7	0.9015	19.7	0.991	21.7	1.044
17.8	0.92	19.8	0.994	21.8	1.046
17.9	0.925	19.9	0.997	21.9	1.048
18.0	0.93	20	1.0	22.0	1.05
18.1	0.934	20.1	1.003	22.1	1.052
18.2	0.938	20.2	1.006	22.2	1.054
18.3	0.942	20.3	1.009	22.3	1.056
18.4	0.946	20.4	1.012	22.4	1.058
18.5	0.95	20.5	1.015	22.5	1.06
18.6	0.954	20.6	1.018	22.6	1.062
18.7	0.958	20.7	1.021	22.7	1.064
18.8	0.962	20.8	1.024	22.8	1.066
18.9	0.966	20.9	1.027	22.9	1.068
				23.0	1.07

En el desarrollo de la estandarización de la prueba control se encontró en primera instancia que la dilución madre mostró un tiempo de muerte de 5 y 7 minutos, donde el ratón (r1) tuvo un tiempo de muerte de 6:21 min y el ratón (r5) el de mayor tiempo que fue de 7:38 min (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Posteriormente se obtuvo un valor de la mediana de muerte de 1.390 y todos los ratones del bioensayo presentaron signos clínicos como parálisis muscular extendida, disnea, muerte por parálisis respiratoria (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Cuadro 3.- Cálculo de factor de conversión de la dilución estándar.

N° ratón	Peso	Inoculación	Última exhalación	Muerte
r2	20.24 g	0:00 s	7:23 min	7:23 min
r5	19.88 g	0:50 s	8:28 min	7:38 min
r9	20.94 g	1:45 min	8:35 min	6:50 min
r8	19.71 g	2:18 min	9:28 min	7:10 min
r1	20.72 g	4:07 min	10:28 min	6:21 min

Cuadro 4.- Cálculo del factor de conversión de dilución

Unidad ratón (UR)	Corrección por peso	Unidades de Ratón Corregidas (URC)	Ordenamiento de datos URC	Mediana de las URC	Signos clínicos
1.328	1.006	1.336	1		Parálisis muscular extendida, disnea, muerte por parálisis respiratoria
1.294	0.997	1.390	3	1.390	Parálisis muscular extendida, disnea, muerte por parálisis respiratoria
1.417	1.027	1.455	4		Parálisis muscular extendida, disnea, muerte por parálisis respiratoria
1.363	0.991	1.351	2		Parálisis muscular extendida, disnea, muerte por

					parálisis respiratoria
1.516	1.021	1.548	5		Parálisis muscular extendida, disnea, muerte por parálisis respiratoria

El valor del FC se utilizó para calcular el límite de cuantificación que resultó ser de 39,65 µg STX /100g, en la prueba control.

Cuadro 5.- Cálculo FC final y del límite de cuantificación

FC PROMEDIO	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN
$FC = \frac{STX \text{ diluida}}{MURC} = \frac{0.333}{1.390} = 0.2395$	$LC = URC \times FC \times 200$
	$LC = (0.8278)(0.2395)(200) = 39.65 \mu\text{g STX eq Kg}^{-1} \text{ tejido}$

Cuadro 6.- Valores de temperatura, pH, salinidad en los meses de Julio-febrero 2019 en los tres bancos de extracción de la laguna de Tampamachoco

Meses	Bancos de ostión	pH	Salinidad ppm	Temperatura °C
julio	Restringa	7.33	29 ppm	29.4°C
	Pipiloya	6.92	30 ppm	29.4°C
	Punta de madero	6.92	27 ppm	31°C
agosto	Restringa	7.02	29 ppm	29°C
	Pipiloya	6.94	27 ppm	29.6°C
	Punta de madero	6.79	25 ppm	30.2°C
septiembre	Restringa	7.05	29 ppm	30°C
	Pipiloya	6.94	27 ppm	30.5°C
	Punta de madero	6.59	26 ppm	30.5°C
octubre	Restringa	7.66	29 ppm	29°C
	Pipiloya	7.71	28 ppm	29°C
	Punta de madero	7.6	27 ppm	30°C
noviembre	Restringa	7.05	30 ppm	30°C
	Pipiloya	6.94	29 ppm	31°C
	Punta de madero	6.59	27 ppm	31°C
diciembre	Restringa	7.24	30 ppm	23°C
	Pipiloya	7.22	31 ppm	22°C
	Punta de madero	7.25	31 ppm	22°C
enero	Restringa	7.66	25 ppm	25°C
	Pipiloya	7.71	26 ppm	26°C
	Punta de madero	7.6	25 ppm	26°C
febrero	Restringa	7.5	28 ppm	27°C
	Pipiloya	7.8	28 ppm	28°C
	Punta de madero	7.8	28 ppm	28°C

Cuadro 7. Valores de temperatura, pH, salinidad en los meses de Julio-febrero 2019 en los tres bancos de extracción de la laguna de Tamiahua

Meses	Bancos de ostión	pH	Salinidad ppm	Temperatura °C
julio	Palma	7.16	32 ppm	29°C
	lagartos	7.25	32 ppm	29°C
	Panzacolas	7.25	32 ppm	30°C
agosto	Palma	7.05	30 ppm	28°C
	lagartos	6.98	29 ppm	28°C
	Panzacolas	7.2	29 ppm	29°C
septiembre	Palma	7.2	30 ppm	29°C
	lagartos	7.18	31 ppm	29°C
	Panzacolas	7.18	31 ppm	28°C
octubre	Palma	7.20	30 ppm	28°C
	lagartos	7.05	30 ppm	29°C
	Panzacolas	7.05	30 ppm	29°C
noviembre	Palma	7.06	32 ppm	28°C
	lagartos	7.17	31 ppm	27°C
	Panzacolas	7.18	31 ppm	28°C
diciembre	Palma	7.16	32 ppm	21°C
	lagartos	7.25	32 ppm	21°C
	Panzacolas	7.25	32 ppm	21°C
enero	Palma	7.18	30 ppm	22°C
	lagartos	7.20	30 ppm	22°C
	Panzacolas	7.20	30 ppm	22°C
febrero	Palma	7.15	31 ppm	22°C
	lagartos	7.18	31 ppm	22°C

	Panzacolas	7.18	31 ppm	22°C
--	------------	------	--------	------