

Identificación y caracterización por LC-MS de derivados del Ácido Okadaico en cultivos de *Prorocentrum belizeanum*.

Beatriz Paz^{3,4}, Antonio H. Daranas^{1,2}, Patricia G. Cruz¹,
José M. Franco^{3,4}, José G. Napolitano¹, Manuel Norte¹ y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Islas Canarias.

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38071, Islas Canarias.

(3) Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36080 Vigo.

(4) Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36200 Vigo.

Resumen

En el presente estudio, las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum* (Ácido okadaico, DTX-5c y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato) fueron analizadas en un sistema de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS), lo que permitió determinar los tiempos de retención (t_R) respectivos y los patrones de fragmentación asociados. Como una muestra de la aplicabilidad de la metodología empleada, diversas muestras provenientes de cultivos *in vitro* de *P. belizeanum* fueron analizadas.

Introducción

Los dinoflagelados del género *Prorocentrum* poseen una amplia distribución geográfica que abarca las regiones tropicales y subtropicales. Algunas especies son reconocidas como productoras de toxinas responsables del síndrome diarreico conocido como DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) [1]. Entre ellas destacan el ácido okadaico (Fig. 1.1), un inhibidor selectivo de las fosfatasa de serina/treonina de tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A), y numerosos compuestos relacionados, como los diol-ésteres y las dinophysistoxinas (DTX's). La mayoría de estas toxinas son lipofílicas [2], aunque en los últimos años han sido detectadas las primeras sustancias hidrosolubles, como es el caso de la DTX-5c (Fig. 1.2), una toxina sulfatada aislada de *P. belizeanum* [3].

Aunque la estructura de muchas de estas toxinas es conocida desde hace más de una década, hasta el momento no se ha desarrollado un método apropiado para la detección e identificación de estas sustancias. En la actualidad el método más común para la detección de toxinas DSP sigue siendo el bioensayo en ratones [4], aunque se trata de una metodología con baja sensibilidad y una pobre reproducibilidad. En la búsqueda de nuevos métodos de detección, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se ha revelado como una poderosa herramienta para la detección de sustancias conocidas, así como para la identificación de nuevas toxinas [5].

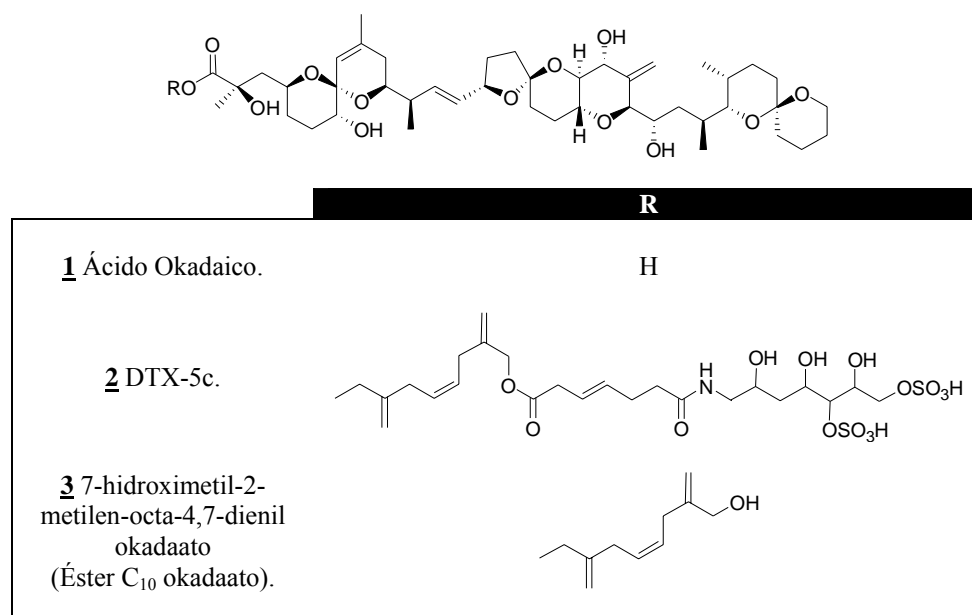


Figura 1. Estructuras de las principales toxinas aisladas de *P. belizeanum*.

En el presente estudio, se ha recurrido a la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para analizar las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*, logrando así determinar los tiempos de retención de Ácido okadaico (Fig. 1.1), DTX-5c (Fig. 1.2) y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato (Fig. 1.3), así como el patrón de fragmentación específico de cada una de estas toxinas.

Materiales y métodos

La identificación y caracterización de la toxinas de interés se llevó a cabo utilizando patrones de ácido okadaico (Fig. 1.1), DTX-5c (Fig. 1.2) y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato (Fig. 1.3), aislados previamente de cultivos de *P. belizeanum* e identificadas a través de resonancia magnética nuclear (RMN) [3]. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna HPLC Waters XBridge C-18 5 mm (150mm x 2,1 mm) utilizando un gradiente de acetato de amonio 2mM (pH 5,8) a metanol. La detección de masas se realizó con un espectrómetro de trampa iónica Thermo Finnigan LCQ-Advantage, equipado con una interfase de ionización en electrospray (ESI).

Resultados y Discusión

De acuerdo con la metodología empleada, y como se puede observar en la Fig. 2, los tiempos de retención para cada una de las toxinas analizadas son los siguientes: Ácido okadaico, $t_R = 7,07$ min., DTX-5c, $t_R = 11,91$ min., y Éster C₁₀ okadaato, $t_R = 25,89$ min. Con respecto a los patrones de

fragmentación, tanto en el ácido okadaico como en el éster C₁₀ okadaato destaca el ión pseudo-molecular correspondiente a $[M+NH_4]^+$ (m/z 822.0 y 972.1, respectivamente), mientras que en el caso de DTX-5c el patrón es más complejo, siendo posible identificar en modo negativo los iones correspondientes a $[M-2H]^{2-}$ (m/z 715.0) y $[M-H]^-$ (m/z 1430.1).

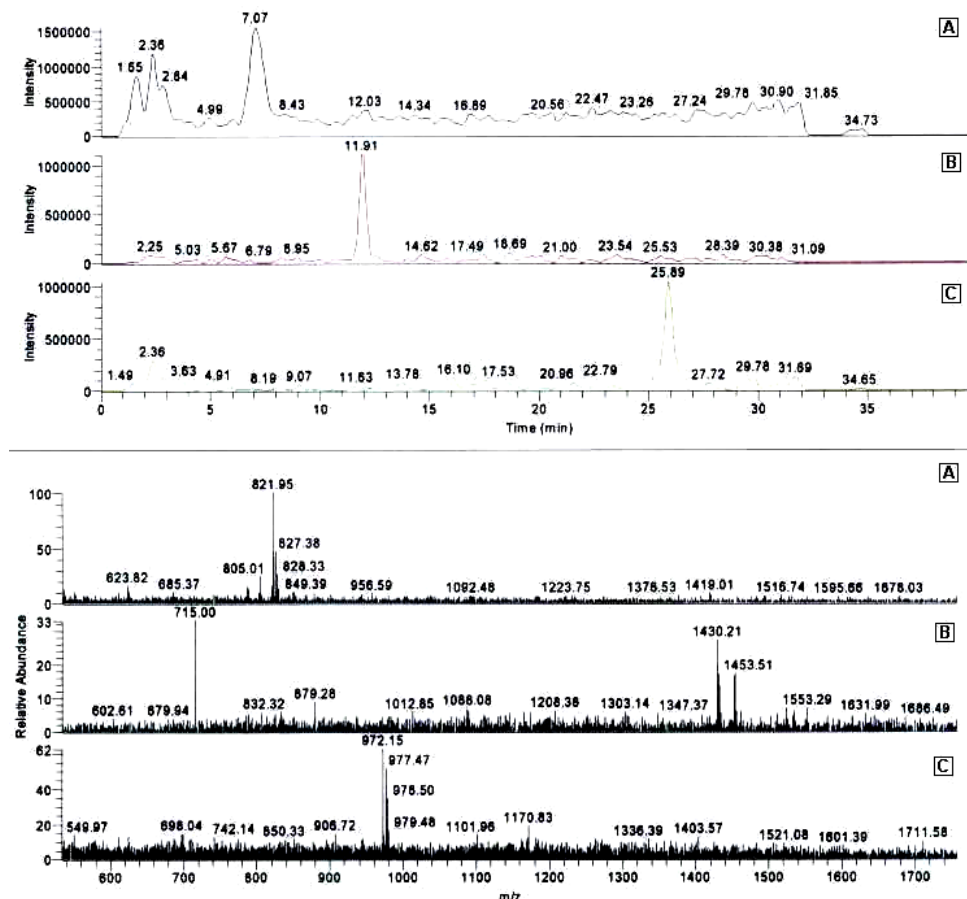


Figura 2. Cromatogramas LC-MS para las principales toxinas de *P. belizeanum*. A: Ácido okadaico (1) m/z 822,0 $[M+NH_4]^+$; B: DTX-5c (2) m/z 1430,2 $[M-H]^-$; C: Éster C₁₀ okadaato (3) m/z 972,1 $[M+NH_4]^+$.

Por último, como una muestra de la aplicabilidad de la metodología empleada, diversas muestras provenientes de cultivos de *P. belizeanum* fueron analizadas. Las tres toxinas mayoritarias fueron detectadas en los extractos celulares (extractos realizados empleando como disolvente acetona y metanol, respectivamente), mientras que en el medio de cultivo sólo se detectaron trazas de ácido okadaico (Fig. 1.1).

Conclusiones

En el presente estudio se han analizado a través de LC-MS las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum*

belizeanum, determinando los tiempos de retención respectivos y estudiando los patrones de fragmentación. Esta metodología puede ser utilizada como un modelo para la caracterización de sustancias relacionadas con el ácido okadaico en extractos celulares.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del MEC (AGL2005-07924-C04-01 y 02/ALI), VALBIOMAR, ICIC (PGC) y CajaCanarias (JGN). La cepa de *P. belizeanum* fue facilitada por el Dr. S. Fraga, del CCVIEO (Vigo, España).

Referencias

- [1] Quilliam, M.A., W.R. Hardstaff, N. Ishida, J.L. McLachlan, A.R. Reeves, N.W. Ross, A.J. Windust. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Sendai, Japan. 289-292.
- [2] Daranas, A.D., M. Norte, J.J. Fernández. 2001. Toxic marine microalgae. *Toxicon*. 39:1101-1132.
- [3] Cruz, P.G., A.H. Daranas, J.J. Fernández, M.L. Souto, M. Norte. 2006. DTX5c, a new OA sulphate ester derivative from cultures of *Prorocentrum belizeanum*. *Toxicon*. 47:920-924.
- [4] Fernández, M.L., D.J.A. Richard, A.D. Cembella. 2003. *In vivo* assays for phycotoxin. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO. Paris. 347-380.
- [5] Quilliam, M. A., N. W. Ross. 1996. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry. En: Snyder, A.P. (Ed). *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ACS Symposium Series, vol. 619. Anaheim, CA. Washington, DC: American Chemical Society. 351-364.