



EFFECTOS TÓXICOS PRODUCIDOS POR ANATOXINA-a: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SU DETECCIÓN



Universidad de Sevilla – Facultad de Farmacia

Carmen Ruiz Espinosa



Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

EFECTOS TÓXICOS PRODUCIDOS POR ANATOXINA-a: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SU DETECCIÓN

Modalidad: TFG de Revisión Bibliográfica

Alumna: Carmen Ruiz Espinosa

Tutora: Dra. Ana Isabel Prieto Ortega

Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología

Facultad de Farmacia – Universidad de Sevilla

Sevilla, Julio 2023

RESUMEN

Las proliferaciones masivas de cianobacterias en aguas ambientales y la consecuente producción de cianotoxinas ha dado lugar a una preocupación general por el riesgo de intoxicaciones para la salud pública. Esta revisión se ha centrado concretamente en la anatoxina-a (ATX-a), una neurotoxina capaz de producir graves efectos en los seres vivos que habitan los sistemas acuáticos, así como en los humanos que consumen alimentos o aguas que han sido expuestas a esta toxina. Por tanto, se han recopilado varios métodos analíticos capaces de detectar la presencia de anatoxinas clasificándolos según su especificidad para la detección de esta toxina sola o junto con otras cianotoxinas como pueden ser las microcistinas (MC), nodularinas (NOD), cilindrospermopsinas (CYN) o saxitoxinas (SAX), simultáneamente.

Los resultados mostraron una amplia variedad de métodos analíticos basados principalmente en bioensayos, métodos cromatográficos, técnicas inmunológicas y biosensores. Los diversos estudios llevaron a cabo la aplicación de estas técnicas en distintas matrices, como el agua, los tejidos y órganos de animales acuáticos o los suplementos alimenticios que contienen algas. Las investigaciones se centraron mayormente en la detección simultánea de ATX-a con otras cianotoxinas siendo los ecosistemas acuáticos de agua dulce los entornos más ampliamente estudiados. Además, la mayoría de ellos fueron sometidos a procesos de validación donde se evaluaron sus límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para confirmar su fiabilidad y reproducibilidad.

No obstante, estos métodos de análisis mostraron ciertas limitaciones que señalan la necesidad de desarrollar nuevos métodos que aporten mayor sensibilidad y especificidad a ATX-a con el objetivo de garantizar la seguridad de la población y del medio ambiente.

Palabras claves: Cianotoxinas, Anatoxina-a, Efectos tóxicos, Métodos de detección.

ABSTRACT

The massive proliferation of cyanobacteria in environmental waters and the consequent production of cyanotoxins has given rise to a general concern about the risk of poisoning for public health. This review has focused specifically on anatoxin-a (ATX-a), a neurotoxin capable of producing serious effects on living beings that inhabit aquatic systems, as well as on human who consume food or water that has been exposed to this toxin.

Therefore, several analytical methods capable of detecting the presence of anatoxins have been compiled, classifying them according to their specificity for the detection of this toxin alone or together with other cyanotoxins such as microcystins (MC), nodularins (NOD), cylindrospermopsins (CYN) and saxitoxins (SAX) simultaneously.

The results showed a wide variety of analytical methods based mainly on bioassays, chromatographic methods, immunological techniques and biosensors.

The various studies carried out the application of these techniques in different matrices, such as water, tissues and organs of aquatic animals or food supplements containing algae. Investigations have mostly focused on the simultaneous detection of ATX-a with other cyanotoxins, with freshwater aquatic ecosystems being the most widely studied environments. In addition, most of them were subjected to validation processes where their limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were evaluated to confirm their reliability and reproducibility.

However, these analysis methods showed certain limitations that indicate the need to develop new methods that provide greater sensitivity and specificity to ATX-a in order to guarantee the safety of the population and the environment.

Key words: Cyanotoxins, Anatoxin-a, Toxic effects, Detection methods.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	8
1.1 Cianobacterias y cianotoxinas	8
1.2. Anatoxina-a.....	11
1.2.1 Anatoxina-a: Estructura y mecanismo de acción tóxico	11
1.2.2 Anatoxina-a: Distribución y concentraciones encontradas	13
1.2.3 Vías de exposición a ATX	15
1.2.4 Efectos tóxicos de la exposición a ATX.	15
2.OBJETIVOS	18
3.METODOLOGÍA	18
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Métodos analíticos específicos de anatoxinas	19
4.2 Métodos analíticos no específicos de ATX-a (MULTITOXINAS)	23
6.BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Floraciones nocivas de cianobacterias. Imagen tomada de la revista Técnica de medio ambiente (RETEMA). Disponible en: https://www.retema.es/actualidad/cianoalert-alerta-inteligente-contra-las-floraciones-nocivas-de-cianobacterias	8
Figura 2. Estructura 2D de la anatoxina-a (a) y análogos: homoanatoxina-a (b), dihidroanatoxina-a (c) y dihidrohomoanatoxina-a (d). Imagen modificada en Chemdraw (Colas et al.,2020).....	11
Figura 3. Mecanismo de acción de la ATX-a (Colas et al.,2020).	12
Figura 4. Distribución a nivel mundial de ATX-a. (Colas et al.,2020).	13
Figura 5. Número de artículos según matriz estudiada (fuente Scopus).	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y características generales de las cianotoxinas más comunes	9
Tabla 2. Efectos tóxicos producidos por ATX-a en diferentes especies animales.	16
Tabla 3. Métodos de detección específicos de ATX-a.	22
Tabla 4. Métodos de detección de ATX-a con diferentes cianotoxinas.	26

Abreviaturas

Ach: Acetilcolina

AchE: Enzima acetilcolinesterasa

ATX-a: Anatoxina-a

CYN: Cilindropermopsinas

dhATX-a: Dihidroanatoxina-a

dhHTX-a: Dihidrohomoanatoxina-a

DI: Inyección directa

DW: dry weight (“peso seco”)

ECD: Detección por captura de electrones

ELISA: Ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas

ESI: Ionización por electropulverización

FL: Fluorescencia

FP: Polarización fluorescente

GC: Cromatografía de gases

HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrofílica

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HTX-a: Homoanatoxina-a

ID: Dilución isotópica

LC: Cromatografía líquida

LD₅₀: Dosis letal 50

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MC: Microcistinas

MLD₁₀₀: Dosis mínima letal 100

MS: Espectrometría de masas

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

NOD: Nodularina

SAX: Saxitoxina

SNC: Sistema nervioso central

SPE: Extracción en fase sólida

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alta resolución

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Cianobacterias y cianotoxinas

Las cianobacterias, también conocidas por algas verdeazuladas, son bacterias gram-positivas primitivas. Son un grupo de microorganismos procariotas fotosintéticos que contribuyen a la generación de oxígeno en la atmósfera terrestre. Además, algunas especies son capaces de fijar nitrógeno contribuyendo así al ciclo del nitrógeno de los ecosistemas terrestres y marinos (Pérez et al., 2008).

Generalmente habitan en ambientes terrestres y acuáticos como suelos, ríos, océanos o lagos; incluso pueden colonizar ambientes marinos y extremos. En los últimos años, debido a diversos factores como el cambio climático y el aumento de la eutrofización de las aguas, se ha producido un crecimiento masivo de cianobacterias en lagos de agua dulce y océanos dando lugar a la formación de grandes floraciones de algas y espumas superficiales denominados cianoblooms (Pineda et al., 2011).

Además, existen también células de cianobacterias capaces de producir vesículas de gas que les aportan flotabilidad, permitiéndoles ubicarse en la superficie (Aráoz et al., 2009).



Figura 1. Floraciones nocivas de cianobacterias. Imagen tomada de la revista *Técnica de medio ambiente (RETEMA)*. Disponible en:

<https://www.retema.es/actualidad/cianoalert-alerta-inteligente-contras-las-floraciones-nocivas-de-cianobacterias>

Ciertas especies de cianobacterias se caracterizan por una alta producción y secreción de toxinas que según las concentraciones alcanzadas pueden llegar a suponer un riesgo para la salud humana y para los animales (Buratti et al., 2017). Las toxinas producidas por

cianobacterias son denominadas cianotoxinas, se trata de un variado grupo de metabolitos secundarios biológicamente activos y tóxicos para algunos organismos eucariotas presentes en los ecosistemas (Boopathi Ki, 2014).

Existe una amplia variedad de cianotoxinas que pueden clasificarse en función de diferentes características como son su estructura química o el efecto toxicológico que producen en los seres vivos. Así, según su estructura química se organizan en péptidos cíclicos (microcistinas, nodularinas), alcaloides (anatoxinas, cilindrospermopsinas, saxitoxina) y lipopolisacáridos. Además, entre los efectos más comunes producidos por las cianotoxinas podemos encontrar los efectos neurotóxicos, hepatotóxicos, citotóxicos o dermatotóxicos entre otros (véase en tabla 1).

Tabla 1. Clasificación y características generales de las cianotoxinas más comunes (Mohamed et al., 2021).

CIANOTOXINAS	GÉNEROS PRODUCTORES CIANOTOXINAS	TOXICIDAD PRINCIPAL	EFFECTOS OBSERVADOS
Péptidos cíclicos			
Microcistinas	<i>Anabaena,</i> <i>Anabaenopsis,</i> <i>Aphanizomenon,</i> <i>Merismopedia,</i> <i>Microcystis,</i> <i>Oscillatoria,</i> <i>Phormidium,</i> <i>Synechococcus,</i> <i>Planktothrix</i>	Hepatotoxicidad	Gastrointestinales, inflamación del hígado e insuficiencia hepática, neumonía, dermatitis
Nodularina	<i>Nodularia, Nostoc</i>	Hepatotoxicidad	Gastrointestinales, insuficiencia hepática, neumonía, dermatitis
Alcaloides			
Anatoxinas	<i>Anabaena,</i> <i>Aphanizomenon,</i> <i>Cylindrospermum,</i>	Neurotoxicidad	Hormigueo, ardor, entumecimiento, somnolencia, habla

	<i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> y <i>Raphidiopsis</i>		incoherente, parálisis respiratoria (muerte)
Cilindrospermopsinas	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Umezakia</i>	Hepatotoxicidad, neurotoxicidad y citotoxicidad	Inflamación y hemorragia gastrointestinales, hepáticas, neumonía, dermatitis
Saxitoxina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i>	Neurotoxicidad	Hormigueo, ardor, entumecimiento, somnia, habla incoherente, parálisis respiratoria (muerte)
<hr/>			
Lipopolisacáridos (LPS)			
Dermatotoxinas	<i>Anacystis nidulans</i> , <i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Dolichospermum sp.</i> , <i>Spirulina platensis</i> y <i>Oscillatoria sp.</i>	No conocida	Reacciones inflamatorias en la piel y molestias gastrointestinales

Debido a que la presencia y acumulación de cianobacterias productoras de cianotoxinas se está convirtiendo en un problema muy frecuente a nivel mundial, la monitorización y el control de las floraciones de cianobacterias es fundamental para poder prevenir la exposición a las cianotoxinas y proteger a todos los seres vivos afectados.

1.2. Anatoxina-a

1.2.1 Anatoxina-a: Estructura y mecanismo de acción tóxico

La anatoxina-a es una cianotoxina con estructura de alcaloide que puede ser sintetizada por diversas especies de cianobacterias como son los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Raphidiopsis* (Colas et al., 2020).

A nivel estructural, la anatoxina-a es una amina secundaria bicíclica que consta de diversos enantiómeros que varían según el radical que se une a la molécula: anatoxina-a (ATX-a): $R_1 = \text{CH}_3$, homoanatoxina-a (HTX-a): $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$, dihidroanatoxina-a (dhATX-a): $R_1 = \text{CH}_3$, dihidrohomoanatoxina-a (dhHTX-a): $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$.

Su fórmula molecular es $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$ y su masa molecular media de 165,237 g/mol.

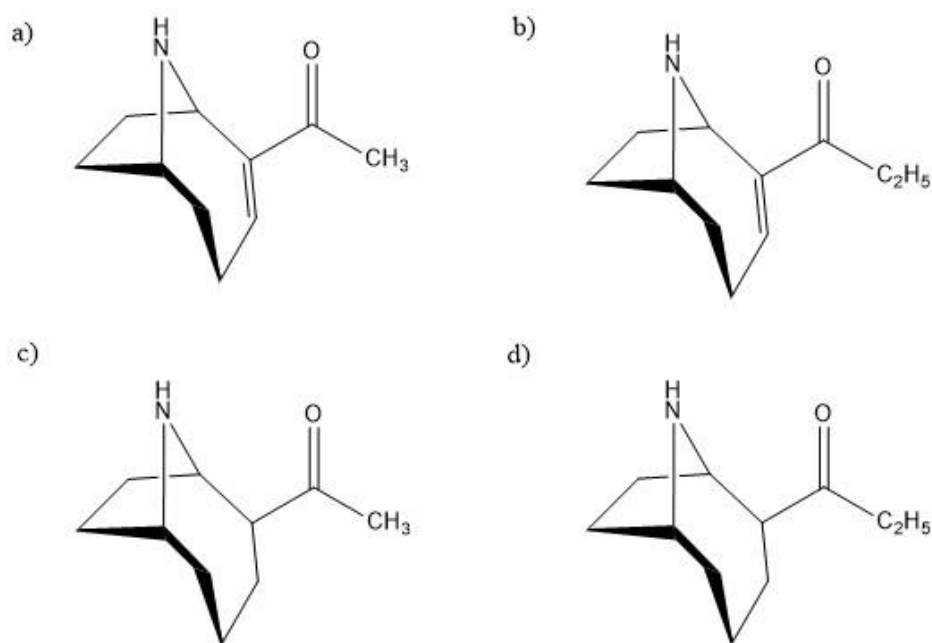


Figura 2. Estructura 2D de la anatoxina-a (a) y análogos: homoanatoxina-a (b), dihidroanatoxina-a (c) y dihidrohomoanatoxina-a (d). Imagen realizada en Chemdraw (Colas et al., 2020).

Con respecto a su mecanismo de acción, se basa en permitir la unión del ligando natural, la acetilcolina (Ach), a su receptor nicotínico (nAChR) presente en el sistema nervioso central (SNC) (Colas et al., 2020).

En condiciones normales, la Ach se une a sus nAChR en la membrana post sináptica neuronal provocando la apertura del canal iónico y desencadenando un cambio conformacional en el receptor. La activación del receptor permite la entrada de iones de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) en la neurona, lo que estimula la membrana postsináptica y provoca la despolarización celular y la generación de potenciales de acción, dando lugar a la contracción muscular. Posteriormente, la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza la acetilcolina en acetato y colina para que puedan ser reutilizados por la neurona.

En el caso de la ATX-a, su unión a los nAChR es irreversible, es decir, no permite la descomposición del complejo nAChR- ATX-a por la AChE. Este hecho provoca una despolarización mantenida de la membrana que como consecuencia da lugar al bloqueo de los nAChR volviéndose estos insensibles y por tanto, provocando la inhibición de la transmisión neuromuscular (Martyn et al., 2009).

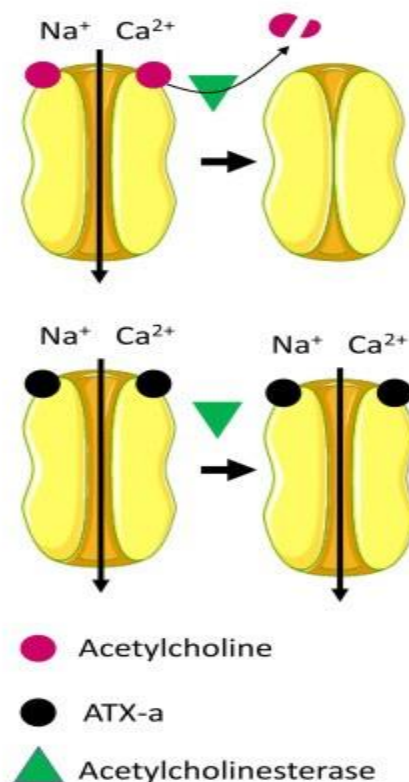


Figura 3. Mecanismo de acción de la ATX-a. Imagen modificada de Colas et al.,2020.

1.2.2 Anatoxina-a: Distribución y concentraciones encontradas

En zonas de agua dulce, esta cianotoxina es sintetizada en grandes cantidades, especialmente durante el crecimiento masivo de cianobacterias en forma de biopelículas o de columnas de agua.

En estudios y análisis específicos sobre la distribución de ATX-a en zonas acuáticas a nivel global diferenciando entre muestras aisladas de cianobacterias planctónicas (flotantes en aguas) y cianobacterias bentónicas (fondo de ecosistemas acuáticos) se evidenció mayormente la existencia de ATX-a procedente de cianobacterias de masas de aguas superficiales en diferentes áreas de Europa, Asia, África y América (Colas et al.,2020).

En cambio, la presencia de ATX-a aislada a partir de cianobacterias bentónicas es mucho menor, sólo se encontraron en Europa.

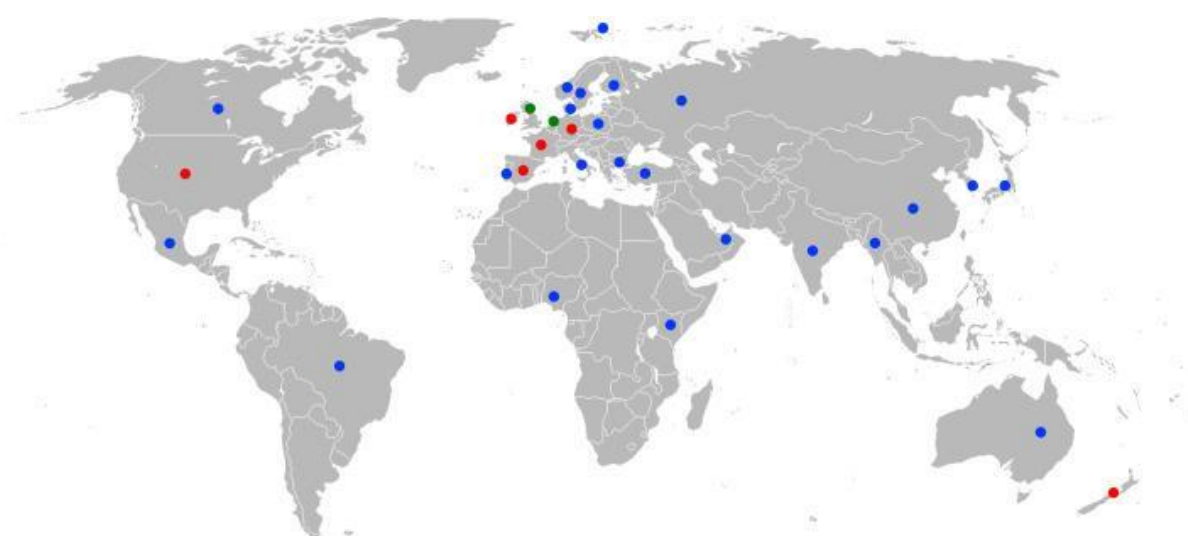


Figura 4. Distribución a nivel mundial de ATX-a. Los círculos azules representan presencia de ATX-a en muestras de cianobacterias planctónicas, los círculos verdes las muestras de biopelículas de cianobacterias bentónicas y los círculos rojos las muestras de ambas. Imagen obtenida de Colas et al.,2020.

Las investigaciones científicas sobre la acumulación de ATX-a en los organismos son escasas, centrándose en su mayoría en las concentraciones de toxina en aguas.

En cuanto a cantidades de biomasa, las densidades de ATX-a oscilan de 0,0015 a 8000 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestras de lechos bentónicos y de 0,3 a 4360 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestras de zonas

pelágicas (Lovin y Brooks, 2019). Así, se registraron concentraciones de ATX-a de 1,89 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW (peso seco) en tapetes bentónicos de la cuenca del río Eel (norte de California) (Bouma-Gregson, 2018), 1,8 a 15,3 mg kg^{-1} DW en el río Tarn (Francia) (Echenique-Subiabre et al., 2018) y 712 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el río Oreti (sur de Nueva Zelanda) (McAllister et al., 2016).

Cuando se cuantifica en volumen de muestras acuáticas, las cantidades de ATX-a varían entre 0,1 y 0,6 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Cerasino y Salmaso, 2012). No obstante, en determinadas situaciones, es posible que dichas concentraciones alcancen niveles superiores como los 144 $\mu\text{g l}^{-1}$ registrados en el lago Anderson y los 122 $\mu\text{g l}^{-1}$ en el lago Leland (Washington, EEUU) en 2009 (Hamel, 2009). Además, en estudios posteriores se observó que las cantidades de ATX-a tanto intracelulares como extracelulares (expresadas en $\mu\text{g l}^{-1}$) en fuentes de agua destinadas a actividades recreativas y consumo humano excedieron los diferentes valores de referencia disponibles. En concreto, se registró que se superaban los valores de 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$, 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ y 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ cuando se producían floraciones de cianobacterias el 79.62, 48.37 y 1.42% del tiempo respectivamente (Lovin y Brooks, 2019).

En general, es difícil cuantificar la presencia de ATX-a durante una proliferación de cianobacterias. Las concentraciones de ATX-a no están relacionadas de manera congruente con la biomasa y varían significativamente en el tiempo y el espacio. Esto puede deberse a la presencia de diferentes genotipos tóxicos y no tóxicos de una misma especie y a la variación en la generación de toxinas (Colas et al., 2020).

En cuanto a la bioacumulación de ATX-a en animales, se realizó un estudio en un lago con floraciones constantes de cianobacterias que demostró la presencia de esta toxina en los peces. Concretamente, la concentración de esta toxina era mayor en el hígado que en los músculos de los peces. Sin embargo, la acumulación de ATX-a en los tejidos musculares de los peces, con concentraciones de hasta 30 ng g^{-1} en peso fresco, indica la posibilidad de su transferencia a través de la cadena trófica (Pawlik-Skowrońska et al., 2012).

Además, también se ha registrado la presencia de esta toxina en otros animales acuáticos como la carpa prusiana (*Carassius gibelio*), la cucaracha omnívora (*Rutilus rutilus*) o el insecto *Chironomus* y en plantas acuáticas (Al-Sammak et al., 2014).

Asimismo, se han detectado concentraciones que varían entre 2,50 y 33 $\mu\text{g g}^{-1}$ en suplementos alimenticios a base de algas que contienen generalmente los géneros *Aphanizomenon* y *Spirulina (Arthrospira)* (Rellán et al., 2009).

1.2.3 Vías de exposición a ATX

La exposición a la ATX-a tiene lugar principalmente mediante vía oral por ingestión accidental de agua contaminada con cianobacterias que producen esta toxina o por consumir alimentos contaminados con ATX-a, suponiendo ambos casos un gran riesgo de intoxicación en animales y humanos (Pérez et al., 2008). También por el consumo de suplementos alimenticios a base de algas contaminadas con cianotoxinas (Ettoumi et al., 2011).

No obstante, también puede producirse por:

- Contacto directo y por tanto exposición de zonas del cuerpo humano a acumulaciones de cianobacterias al realizar alguna actividad acuática.

- Inhalación por aerosoles acuáticos durante actividades en aguas contaminadas.

La ATX-a puede permanecer en el medio terrestre o acuático durante un tiempo determinado llegando a bioacumularse en los organismos que componen la cadena alimentaria y provocando daños en los seres vivos (Wood., 2016).

1.2.4 Efectos tóxicos de la exposición a ATX.

Es importante tener en consideración que la exposición a ATX puede conllevar a efectos tóxicos tanto en los seres humanos como en los animales. La peligrosidad de estos efectos puede variar en función de la cantidad de toxina a la que ha sido expuesto, el tiempo y la vía o zona de exposición (Stevens y Krieger., 1991).

Esta cianotoxina provoca principalmente manifestaciones neurotóxicas que, en ocasiones, pueden ser mortales para los peces, los animales y los seres humanos (Metcalf et al., 2021).

Los síntomas más comunes son dificultad o pérdida de coordinación motora (ataxia), contracciones musculares involuntarias y dolorosas, producción excesiva de saliva, aumento del lagrimeo, sensaciones anormales en la piel (parestias), dificultad visual, sensación de mareo o vértigo, cefaleas, sensación de debilidad y fatiga, episodios de convulsiones, dificultad para respirar o deficiencia de aporte de oxígeno al cerebro (hipoxia) (Mahmood y Carmichael, 1986).

Además, se ha comprobado que la ATX-a interviene en la función de la dopamina en el SNC (Soliakov et al.,1995), en la regulación de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca (Adeyemo y Sirén, 1992).

Diferentes efectos tóxicos han sido reportados en animales expuestos a ATX-a (Tabla 2). No obstante, respecto a los datos encontrados en aves cabe mencionar que se tratan de notificaciones muy antiguas de intoxicaciones por ATX-a y que no se han llevado a cabo investigaciones con ATX-a pura en esta especie.

Tabla 2. Efectos tóxicos producidos por ATX-a en diferentes especies animales.

ESPECIE ANIMAL	CONDICIONES DE EXPOSICIÓN	EFEECTO TÓXICO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Peces Cyprinus carpio L	Exposición a suspensiones de cianobacterias (10^5 y 10^7 cél ml ⁻¹)	Movimiento opercular rápido y nado anormal. Muerte a máximas concentraciones.	(Osswald et al., 2007)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Administración de dosis subletales de ATX-A ($0,08-0,31 \mu\text{g g}^{-1}$) por vía intraperitoneal	Dificultades motoras	(Osswald et al., 2013)
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Exposición a $400 \mu\text{g l}^{-1}$ de ATX-A	Alteración de la frecuencia cardíaca	(Oberemm et al., 1998)
Crustáceos <i>Artemia salina</i>	Exposición a concentraciones de 2 a 14mg l^{-1} de ATX-a	Natación anormal y muerte.	(Lahti et al., 1995)
<i>Daphnia magna</i>	Exposición a concentraciones desde 0 a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ATX-a	Alteraciones en la velocidad de natación, disminución de las funciones motoras, de la frecuencia cardíaca y del consumo de oxígeno	(Bownik y Pawlik-Skowrońska., 2019)
Aves Flamencos	Consumo de agua dulce o salobre y exposición corporal	Convulsiones y muerte	(Krienitz et al., 2003)

menores	en lago alcalino Bogoria (Kenia)		
Pato	Hallado en la zona del litoral del lago Shoormast (Irán)	Muerte	(Nowruzi et al., 2018)
Mamíferos			
Perros	Consumo de agua contaminada por ATX-a en la costa de Loch Insh (Escocia)	Muerte	(Edwards et al., 1992)
	Consumo de perifiton y exposición a agua del río Mataura (Nueva Zelanda)	Convulsiones y muerte	(Hamill., 2001)
Terneros	Administración de dosis orales letales de suspensiones de células liofilizadas del tóxico <i>Anabaena flos-aquae</i>	Muerte por paro respiratorio. Temblores, alteración motora y parálisis de músculos respiratorios.	(Carmichael et al. 1975)
Ratas			
Plantas			
<i>Vallisneria natans</i>	Exposición a concentraciones entre 0,05 y 5,00 $\mu\text{g l}^{-1}$ de ATX-a	Alteración de homeostasis, inducción de mecanismos de defensa y alteración de biopelículas del sistema acuático	(Li et al., 2020)
<i>Lemna minor</i>	Exposición a concentraciones de 5,00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ATX-a	Disminución de la biomasa	(Kaminski et al., 2014)
<i>Medicago sativa</i>	Exposición a concentraciones de 5,00 $\mu\text{g l}^{-1}$	Inhibición de la germinación y el crecimiento de raíces	(Pflugmacher et al., 2006)

2.OBJETIVOS

Con los antecedentes anteriores, el objetivo del presente trabajo fue investigar los diferentes métodos analíticos disponibles para la detección y cuantificación de ATX-a en diferentes matrices ya que es fundamental poder disponer de datos reales y fiables de la presencia de ATX-a. Esto es fundamental para poder realizar una correcta evaluación del riesgo y poder aplicar medidas de prevención de su exposición para proteger a la población tomando medidas de acción apropiadas.

Como objetivos secundarios nos interesó conocer la calidad de los métodos analíticos disponibles, así como su especificidad (si son solo para ATX-a o métodos multitoxina).

3.METODOLOGÍA

Para la elaboración de la presente revisión bibliográfica se realizó previamente una búsqueda bibliográfica de información referente a los conceptos básicos sobre las cianobacterias y las cianotoxinas en diversas bases de datos y fuentes bibliográficas.

Las principales bases de datos utilizadas han sido Pubmed, Scopus, ScienceDirect y Google Académico.

Para la búsqueda de artículos se han utilizado los términos clave “cyanobacteria”, “cyanotoxin”, “anatoxin-a”, “toxic effects”. “neurotoxicity”, “detection methods”.

Además, se han analizado algunos artículos pertenecientes a las bibliografías para aumentar la búsqueda.

Los **criterios de inclusión** utilizados para la selección de los artículos han sido: artículos centrados principalmente en ATX-a, relevancia de artículos en función del número de veces que han sido citados, artículos publicados en revistas científicas de reconocido prestigio, artículos en inglés y español.

Los **criterios de exclusión** han sido: sólo disponibilidad de resúmenes, artículos publicados en un idioma diferente a español o inglés y artículos sin relación con el tema.

Como recurso para la traducción de los artículos se ha utilizado los conocimientos personales del idioma (inglés), el traductor de Google y el diccionario Wordreference.

En cuanto a las imágenes y figuras añadidas, algunas son extraídas de los artículos seleccionados y otras han sido modificadas parcialmente con aplicaciones como “Chemdraw”, “Canva” o “Excell”.

Como herramienta de ayuda para la realización de la bibliografía y referencias se ha utilizado “Mendeley” un gestor de bibliografías que ha facilitado la organización de las referencias y documentos mediante un archivo personal.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ante la preocupación generalizada por el aumento de floraciones de cianobacterias en el mundo se han desarrollado a lo largo de los años una gran variedad de técnicas analíticas para el control de las principales toxinas algales como son las microcistinas, nodularinas, anatoxinas, cilindrospermopsinas y saxitoxinas. Así, estos métodos se pueden diferenciar principalmente en los que son específicos para una sola toxina (ATX-a) y los que son de tipo multitoxina.

4.1 Métodos analíticos específicos de anatoxinas

Son métodos diseñados para detectar y cuantificar selectivamente a la ATX-a en diferentes muestras principalmente de agua contaminada con esta cianotoxina. Proporcionan información sobre su concentración y permiten evaluar los riesgos. Se pueden clasificar según sean métodos no cromatográficos (biológicos) o métodos cromatográficos.

-Métodos biológicos:

Aprovechando la elevada toxicidad de esta cianotoxina en mamíferos se realizaron bioensayos en ratones mediante la administración intraperitoneal (IP). Este enfoque permitió evaluar la existencia de ATX-a determinando la dosis letal 50 (LD₅₀) o la dosis mínima letal (MLD). La presencia de las neurotoxinas se manifiesta por síntomas de intoxicación como la muerte rápida tras convulsiones y la insuficiencia respiratoria.

Además, se están realizando otro tipo de ensayos biológicos que usan organismos de estudio utilizados normalmente en estudios de toxicología ambiental como por ejemplo las crías del crustáceo *Thamnocephalus platyurus* (Törökné et al., 2000) o las larvas de *Artemia salina* (camarones de salmuera) (Lahti et al., 1995).

Sin embargo, ambas pruebas presentan ciertos inconvenientes como son la baja selectividad a elevadas dosis y la necesidad de grandes cantidades de muestra para la evaluación (Osswald et al., 2007).

Actualmente, el desarrollo de anticuerpos dirigidos específicamente hacia ATX-a ha dado lugar a la utilización de ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) llegando

a comercializarse kits ELISA que tienen la capacidad de detectar ATX-a en concentraciones de hasta $0,15 \mu\text{g l}^{-1}$ (Colas et al., 2021).

Para resolver las limitaciones de sensibilidad y especificidad de los bioensayos se ha creado un biosensor amperométrico serigrafiado altamente sensible para la detección precisa de la concentración de ATX-a. Su sensibilidad se mejoró mediante la modificación genética de la AchE y una combinación estratégica de mutaciones logró una mayor especificidad del analito. Este enfoque permitió aumentar la capacidad de detección y selectividad del sistema. Así, se llevó a cabo la detección de ATX-a en muestras de lagos afectados por floraciones de cianobacterias mediante un grupo de cuatro mutantes de AchE, dos de los cuales eran sensibles a la ATX-a y los otros dos a insecticidas. Todas las mediciones se realizaron tras sumergir durante un periodo de 10 minutos el electrodo en una solución acuosa. Los resultados mostraron que los mutantes de las enzimas Y71D, Y73Q e Y71A (sensibles) fueron capaces de detectar $0,5 \text{ nmol}$ de ATX-a por litro mientras que los mutantes E69W y E69Y (insensibles) tenían límites de detección 16 y 50 veces mayores que los mutantes sensibles. De esta manera, se pudo comprobar que la especificidad de los ensayos espectrofotométricos se mantuvo en las enzimas inmovilizadas (Devic et al., 2002).

-Métodos cromatográficos:

La gran toxicidad de la ATX-a incluso en concentraciones muy bajas y las regulaciones internacionales establecidas para este tipo de compuestos han impulsado una investigación intensiva enfocada principalmente en mejorar las metodologías analíticas para aumentar la sensibilidad de detección.

La cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FL) se utilizó para evaluar la existencia de ATX-a en diversos suplementos dietéticos que incluían cianobacterias (Rellán et al., 2009). Para confirmar los límites del método, se llevaron a cabo experimentos adicionales donde se añadieron muestras secas de suplementos libres de contaminantes con una cantidad precisa de patrón de ATX-a. También se verificó la presencia de ATX-a utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) después de su derivatización. Durante la validación de los métodos GC-MS y HPLC-FL, se realizaron evaluaciones para determinar los efectos de la matriz en el rendimiento del método. Se llevó a cabo una comparación entre la señal obtenida al analizar el estándar de ATX-a diluido en metanol y la señal obtenida al analizar la misma cantidad de patrón diluido en un blanco. Esto permitió establecer como la presencia de la matriz afecta las respuestas de los detectores (Rellán et al., 2009). Los

resultados no mostraron un efecto notable en la respuesta de ATX-a mediante HPLC-FL al analizar la muestra de matriz. Sin embargo, en el caso de GC-MS, se encontró una supresión del 13% en la respuesta de ATX-a (Rellán et al., 2009).

En general los métodos de cromatografía líquida acoplada a radiación ultravioleta (LC-UV) presentan limitaciones en cuanto a la sensibilidad, la presencia de interferencias y los productos derivados de la degradación. Por esto, con el fin de aumentar la selectividad y el límite de detección (LOD) de la ATX-a se utiliza la derivatización y la fluorescencia (Osswald et al., 2007).

Así, se diseñó un método basado en la polarización fluorescente (FP) que consiste en marcar un nAChR con un derivado de fluoresceína. Esta estrategia muestra la capacidad de la toxina para interactuar con su objetivo dentro de la célula. Se evaluaron las interacciones entre la toxina y el receptor mediante la medición de las variaciones en la FP de un conjugado unido a membrana-nAChR-F expuesto a diferentes concentraciones de ATX-a. Los resultados revelaron una correlación positiva entre la concentración de ATX-a en la muestra y las modificaciones en el grado polarización de la luz transmitida por el nAChR-F, lo que confirmó que existía interacción entre ambas moléculas (Sánchez et al., 2014).

También se empleó la extracción en fase sólida (SPE) acoplada con cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para la detección de ATX-a en muestras de agua dulce que presentan proliferaciones de cianotoxinas. Se realizó una evaluación sistemática de los efectos de la matriz en la magnitud de la señal de las toxinas en muestras de SPE. Durante el análisis mediante UPLC-MS/MS se observó una supresión significativa en la intensidad de la señal de la toxina. Se realizó una evaluación exhaustiva de la elección de estándares internos (IS) con el fin de compensar o modificar las disminuciones de concentraciones de las cianotoxinas durante el proceso de preparación de muestras y mitigar los efectos de la matriz de detección en los estudios de UPLC-MS/MS. Así, se determinó que el acetaminofén-d4, resultó ser un estándar interno apropiado para compensar los efectos de la matriz en la magnitud de la señal de ATX-a. Por otro lado, la utilización de L-fenilalanina-d5 o cafeína-d9 como estándares internos para compensar los efectos de la matriz en estas toxinas no fue eficaz (Tran et al., 2020).

Recientemente se ha desarrollado un método de detección de ATX-a utilizando un aptasensor colorimétrico de alta sensibilidad, rápido y sencillo. Como agente de detección

utiliza un ADN aptámero y como sondas nanopartículas de oro (AuNP). Cuando el aptámero se une específicamente a la ATX-a, experimenta un cambio en su estructura que conduce a la agregación de las AuNP. En una solución de NaCl esta agregación provoca un cambio de color de las AuNP, pasando de rojo a azul. La variación en el color de las nanopartículas está estrechamente relacionada con la concentración de ATX-a, y se puede cuantificar de manera sencilla usando un espectrofotómetro UV/Vis. Este nuevo enfoque propuesto fue aplicado exitosamente para el análisis de muestras de aguas procedentes de lagos. Así, este aptasensor es una prometedora alternativa como método rápido de detección de ATX-a en muestras ambientales (Nguyen y Jang., 2021).

Tabla 3. *Métodos de detección específicos de ATX-a.*

MÉTODO ANALÍTICO (ATX-a)	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)	VALIDADO	MATRIZ DE DETECCIÓN	DE REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Biosensor electroquímico con ingeniería de AchE	LOD (nmol l ⁻¹): 0.5 LOQ: -	No	Agua	(Devic et al., 2002)
HPLC-FL	LOD (µg g ⁻¹): 3 LOQ (µg g ⁻¹): 10	Si	Suplemento alimenticio	(Rellán et al., 2009)
GS-MS	LOD (µg l ⁻¹): 24 LOQ (µg l ⁻¹): 70	Si	Suplemento alimenticio	(Rellán et al., 2009)
FP	LOD (nM): 33.3 LOQ (nM): 100	Si	Agua	(Sánchez et al., 2014)
SPE-UPLC-MS/MS	LOD (ng l⁻¹): ATX-A: 1.3 HTX-A: 0.6 LOQ (ng l⁻¹): ATX-A: 4 HTX-A: 2	Si	Agua	(Tran et al., 2020)

Biosensor colorimétrico	LOD (pM): 4.45 LOQ (pM): 10 – 200	No	Agua	(Nguyen y Jang., 2021)
ELISA	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$): 0,15 LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$): 220,5	Sí	Agua	(Bauer et al., 2022)

HPLC-FL: cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia; **GC-MS:** cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; **FP:** polarización fluorescente; **SPE:** extracción en fase sólida; **UPLC-MS/MS:** cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas en tándem **ELISA:** ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

4.2 Métodos analíticos no específicos de ATX-a (MULTITOXINAS)

Son métodos analíticos que permiten detectar varias cianotoxinas a la vez en la misma muestra (Tabla 4).

La cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) es una eficaz herramienta para el análisis de varios analitos en una amplia variedad de matrices debido a su sensibilidad y selectividad. Este método fue utilizado para la determinación de MC, CYN y ATX-a. Se llevó a cabo un estudio para evaluar el uso de columnas de menor tamaño, con partículas menores a 2 μm con el objetivo de mejorar la rapidez, sensibilidad y resolución de los análisis, además de cuantificar las cianotoxinas en una sola prueba. Para ello, se empleó la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) en conjunto con la espectrometría de masas en tándem. Se analizaron muestras de agua natural y muestras enriquecidas para demostrar la eficiencia de la técnica. Los resultados demostraron que el método permitió separar de manera clara las distintas cianotoxinas (MC, CYN y ATX-a) en un solo análisis y en unos ocho minutos, obteniendo una alta especificidad y recuperación de los picos (Oehrle et al., 2010).

La técnica de extracción en fase sólida en línea acoplada a espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (SPE-LC-HESI-MS/MS) fue creada para la identificación y cuantificación de las cianotoxinas MC, ATX-a y CYN en muestras de agua dulce. Se utilizó un volumen de inyección de 2 mL ajustado según la concentración prevista de cianotoxinas en la muestra. Este método permite realizar el análisis de cada muestra en unos 7 minutos, logrando buenos valores de recuperación (91-101%) y una buena precisión. Se llevaron a cabo experimentos de optimización y validación del

método de SPE y la separación cromatográfica utilizando muestras de aguas con proliferaciones de algas de relevancia ambiental. Durante el análisis, se logró detectar todas las cianotoxinas exceptuando la CYN (Fayad et al., 2015).

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LS-MS) es un método de análisis rápido y altamente sensible para la detección de diferentes cianotoxinas entre las que se incluyen MC, nodularina (NOD), ATX-a y CYN. Este método usa una cantidad reducida de muestra y dilución directa con metanol. El tiempo de análisis fue de 12 min con una distinción precisa de las diferentes toxinas. La prueba de validación reveló una sensibilidad destacable con límites de detección inferiores a 100 ng l⁻¹. precisión y exactitud. La sencillez del pretratamiento de muestras y la rapidez de análisis hace que este método sea ideal para la monitorización y el análisis eficiente de aguas (Wang et al., 2016).

Haddad et al. (2019) utilizaron la cromatografía líquida de dilución isotópica y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para la detección de MC, NOD, ATX-a, CYN y saxitoxina (SAX) tanto en muestras de agua ambiental como en tejidos de peces. Se combinaron técnicas de separación y extracción con el fin de optimizar el proceso de aislamiento y aumentar la sensibilidad en la detección. En este estudio, se llevó a cabo una evaluación de una columna de LC de interacción hifrofílica zwitteriónica para la separación de ATX-a, CYN y SAX. Los resultados revelaron una gran sensibilidad para las diferentes toxinas en comparación con las técnicas previamente utilizadas. Además, se realizó una validación del método mediante el uso de estándares internos marcados isotópicamente, siendo esta la primera vez que se realiza. Este enfoque permitió una mejor corrección de los sesgos de recuperación y la supresión de la influencia de la matriz en los resultados.

La técnica de inyección directa (DI) acoplada a cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) fue desarrollada para la detección de ATX-a, CYN y HTX-a en muestras de agua dulce que presentan proliferaciones de cianotoxinas. Se realizó una evaluación sistemática de los efectos de la matriz en la magnitud de la señal de las toxinas en muestras de DI. Durante el análisis mediante UPLC-MS/MS se observó una supresión significativa en la intensidad de la señal de CYN, ATX-a y HTX-a. Se realizó una evaluación exhaustiva de la elección de estándares internos (IS) con el fin de compensar o modificar las disminuciones de concentraciones de las cianotoxinas durante el proceso de preparación de muestras y mitigar los efectos de la matriz de detección en los estudios de UPLC-MS/MS. Este

método demostró un límite de detección (LOD) para las toxinas objetivo en el rango de 0,6 a 15 ng l⁻¹, lo cual indica una sensibilidad adecuada para identificar la presencia de estas cianotoxinas en las floraciones de cianobacterias. El estudio demostró que las cianotoxinas ATX-a, CYN y HTX-a estaban presentes de manera generalizada en las muestras de agua, con concentraciones que variaban de 70 a 24600 ng l⁻¹ (Tran et al., 2020).

Recientemente un estudio describe un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la detección y cuantificación de varias cianotoxinas en moluscos bivalvos de consumo humano. Abarca un total de 17 cianotoxinas que incluyen a MC, NOD, ATX-a, HTX-a y CYN. Este método destaca por la capacidad de la MS para detectar y distinguir de manera individual las señales MRM de MC-Lr-[Dha7] y MC-LR-[Asp3], dos semejantes que previamente se detectaban juntos y ahora pueden ser distinguidos por la MS. Para evaluar la eficacia del método, se realizó una validación interna usando muestras de mejillón con concentraciones que variaban entre 3,12 y 200 µg kg⁻¹. El método mostró una linealidad adecuada en el rango de calibración para las cianotoxinas analizadas, a excepción de CYN. Las recuperaciones de las cianotoxinas estuvieron por debajo de los niveles deseados (<70 %), pero se mantuvieron estables. A pesar de presentar ciertas limitaciones, los resultados obtenidos en la validación demostraron que el método era robusto y específico (España Amórtegui et al., 2023).

También se ha usado la cromatografía líquida de interacción hidrofílica acoplada con espectrometría de masas en tándem (HILIC-MS/MS) como estrategia analítica para la detección de cianotoxinas en suplementos dietéticos de algas verdeazuladas (BGA). Se realizó la separación de diversas cianotoxinas, como la microcistina-leucina-arginina (MC-LR), microcistina-arginina-arginina (MC-RR), NOD, ATX-a y aminoácidos no proteicos, utilizando la columna SeQuant ZIC-HILIC. Para la extracción de las toxinas, se utilizó un enfoque combinado de extracción sólido-líquido (SLE) y extracción en fase sólida (SPE). El método se sometió a un proceso de validación utilizando suplementos dietéticos de cianobacterias y se determinaron los límites de cuantificación en un rango de 60 a 300 µg·kg⁻¹ (Aparicio-Muriana et al., 2023).

Tabla 4. Métodos de detección de ATX-a con diferentes cianotoxinas.

TOXINAS DETECTA DAS	MÉTODO ANALÍTICO	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICA CIÓN (LOQ)	VALIDADO	MATRIZ DE DETECCIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁF ICA
MC, CYN y ATX-a	UPLC- LC/MS/MS	LOD (ppb): MC RR: 0.21 MC LR: 0.10 MC LF: 0.20 CYN: 0.17 ATX-a: 0.13 LOQ (ppb): -	Sí	Agua	(Oehrle et al., 2010)
MC, CYN y ATX-a	SPE-LC- HESI-MS/MS	LOD (ng l ⁻¹): 0,01–0,02 LOQ: -	Si	Agua	(Fayad et al., 2015)
MC, NOD, CYN y ATX-a	LC-MS	LOD (ng l ⁻¹): <100 LOQ (mg l ⁻¹): 0,1-0,3	Si	Agua potable	(Wang et al., 2016)
MC, NOD, ATX-a, CYN, SAX	ID-LC- MS/MS	LOD (ng ml ⁻¹): 0,004-0,08 LOQ (ng ml ⁻¹): 0,01–0,28	Si	Agua y tejido de pescado	(Haddad et al., 2019)
ATX-a, CYN y HTX-a	DI-UPLC- MS/MS	LOD (ng l ⁻¹): CYN: 15 ATX-A: 70 HTX-A: 33 LOQ (ng l ⁻¹): CYN: 50 ATX-A: 240 HTX-A: 100	Si	Agua	(Tran et al., 2020)

MC, NOD, ATX-a, HTX-a y CYN.	LC-MS/MS	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$): Si 2,10 -4,04 LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$): 6,50 -12,11	Moluscos bivalvos	(España Amórtegui et al., 2023)
MC-LR, MC-RR, NOD, ATX-a	HILIC-MS/MS)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$): Si 15 -90 LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$): 60 - 300	Suplementos dietéticos	(Aparicio-Muriana et al., 2023)

UPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución; **LC/MS/MS:** cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem; **SPE-LC-HESI-MS/MS:** extracción en fase sólida en línea acoplada a espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida; **LC-MS:** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; **ID-LC-MS/MS:** cromatografía líquida de dilución isotópica acoplada a espectrometría de masas en tándem; **DI-UPLC-MS/MS:** inyección directa acoplada a cromatografía líquida de ultra alta resolución y espectrometría de masas en tándem; **LC-MS/MS:** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; **HILIC-MS/MS:** cromatografía líquida de interacción hidrofílica acoplada con espectrometría de masas en tándem

Tras esta recopilación bibliográfica de métodos analíticos para la detección de ATX-a se ha observado que, en los inicios, los estudios e investigaciones se centraron en el uso de bioensayos a base de organismos vivos o componentes biológicos para detectar las toxinas. Sin embargo, la investigación y el avance tecnológico dio lugar a la creación de métodos más avanzados y al desarrollo de técnicas analíticas más sofisticadas como la cromatografía, los ensayos inmunológicos y las técnicas basadas en la tecnología que superaron las limitaciones de sensibilidad y especificidad que estos bioensayos presentaban y que dificultaba la atribución precisa de la presencia de esta toxina.

No obstante, los bioensayos siguen siendo útiles para la evaluación toxicológica general de una muestra o el monitoreo a largo plazo de la calidad del agua.

Así, la mayoría de los métodos de detección de cianotoxinas se basan en técnicas cromatográficas que requieren de equipos especializados, recursos y personal altamente capacitado para su implementación. Aunque estos métodos disminuían las limitaciones anteriores, la presencia de interferencias de otros compuestos también supone diferencias

en términos de sensibilidad, especificidad, además de la rapidez, el costo y la complejidad técnica, que implican ciertas dificultades en su aplicabilidad y uso generalizado.

Recientemente, se ha desarrollado un mayor enfoque en la creación de biosensores electroquímicos basados en afinidad, que permiten una detección más rápida y precisa superando así algunas de las limitaciones asociadas a los métodos convencionales que se vienen utilizando. Además, la creación de biosensores portátiles permitiría análisis inmediatos de los cuerpos de aguas y una temprana detección de las deficiencias en el tratamiento de las aguas de consumo humano posibilitando la adopción de medidas rápidas de corrección.

Al examinar los estudios sobre los métodos de detección de ATX-a y categorizarlos en específicos y no específicos, se ha comprobado que, a pesar de la diversidad de métodos disponibles, la mayoría se enfoca en la detección simultánea de varias cianotoxinas (MC, CYN, NOD, SAX, ATX-a), siendo la MC la más investigada y estudiada hasta la fecha. No obstante, es importante destacar que en los últimos años debido al cambio climático y al aumento de floraciones algales se ha percibido un creciente interés en la investigación y desarrollo de nuevos métodos de detección más específicos y sensibles para la ATX-a. Además, en cuanto a las matrices de estudio se refiere se podría decir que la mayoría de las investigaciones encontradas se han realizado en muestras de agua dulce como lagos y ríos o en aguas de consumo humano siendo por el contrario muy escasas las investigaciones y análisis de ATX-a en animales o suplementos dietéticos. Esto supone una gran limitación en cuanto a la posibilidad de evaluación del riesgo por exposición ATX-a (Figura 5).

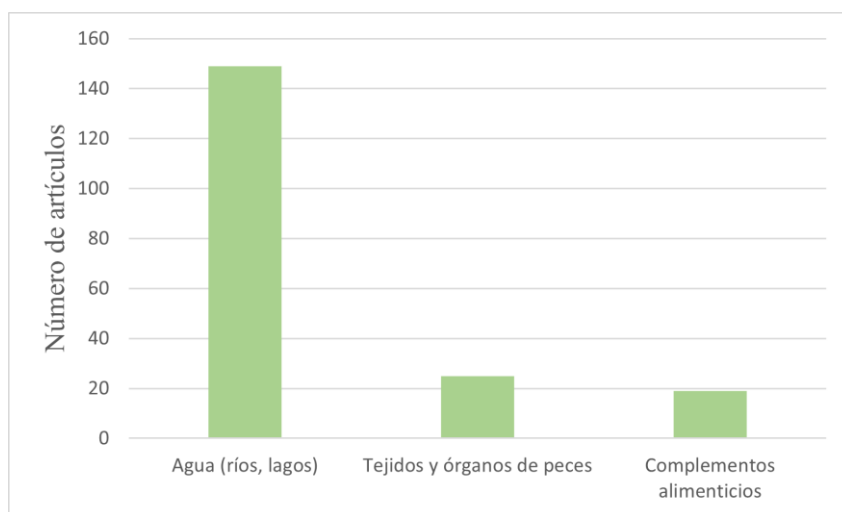


Figura 5. Número de artículos según matriz estudiada (fuente Scopus).

A excepción de los biosensores, en general, los métodos analíticos mencionados han sido sometidos a un proceso riguroso de validación con el fin de comprobar y confirmar que estos cumplen con el objetivo de análisis previsto y que los resultados obtenidos son fiables y precisos. También se han realizado análisis de las concentraciones mínimas de toxina detectables por cada técnica analítica y la capacidad de medir con precisión y exactitud una concentración mínima de analito dentro de los límites determinados.

5.CONCLUSIONES

-Existen múltiples métodos de análisis para la cuantificación y determinación de la ATX-a en diferentes matrices como aguas superficiales, muestras de tejidos y órganos de peces/animales acuáticos o complementos alimenticios a base de algas, siendo mayoritarios los métodos de determinación de ATX-a en agua con respecto a las demás matrices.

-Los estudios llevados a cabo hasta el momento indican una clara tendencia en la investigación a la detección conjunta de ATX-a con otras cianotoxinas en lugar de enfocar los estudios exclusivamente a la detección de ATX-a de forma aislada.

-Los métodos analíticos examinados han demostrado su validez mediante pruebas en las cuales se han estudiado y determinado los límites de detección (LOQ) y cuantificación (LOD) mostrándose de manera concluyente que estos métodos pueden proporcionar resultados fiables, precisos y reproducibles para la detección de ATX-a en diferentes condiciones y entornos, aunque presenten ciertas limitaciones de especificidad y selectividad.

-Al comprender los métodos de detección existentes y las limitaciones asociadas, se puede enfatizar en la necesidad de desarrollar técnicas más sensibles y específicas de ATX-a para garantizar la seguridad del suministro de agua y disminuir los riesgos por exposición a ATX-a.

6.BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah MF, Van Hassel WHR, Andjelkovic M, Wilmotte A, Rajkovic A. Cyanotoxins and Food Contamination in Developing Countries: Review of Their Types, Toxicity, Analysis, Occurrence and Mitigation Strategies. *Toxins (Basel)*. 2021 ;13(11):786.
- Adeyemo OM, Sirén AL. Cardio-respiratory changes and mortality in the conscious rat induced by (+)- and (+/-)-anatoxin-a. *Toxicon*. 1992;30(8):899-905.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Cassada D, Snow DD. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins (Basel)*. 2014 Jan 28;6(2):488-508.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Snow DD, Cassada D. Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon*. 2013;76:316-325.
- Aparicio-Muriana MDM, Lara FJ, Olmo-Iruela MD, García-Campaña AM. Determination of Multiclass Cyanotoxins in Blue-Green Algae (BGA) Dietary Supplements Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)*. 2023;15(2):127.
- Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*. 2010;56(5):813-828.
- Bauer F, Stix M, Bartha-Dima B, Geist J, Raeder U. Spatio-Temporal Monitoring of Benthic Anatoxin-a-Producing *Tychonema* sp. in the River Lech, Germany. *Toxins (Basel)*. 2022;14(5):357.
- Bertrand D, Terry AV Jr. The wonderland of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*. 2018;151:214-225.
- Boopathi T, Ki JS. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins (Basel)*. 2014;6(7):1951-1978.
- Bouma-Gregson K, Kudela RM, Power ME. Widespread anatoxin-a detection in benthic cyanobacterial mats throughout a river network. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197669.
- Bownik A, Pawlik-Skowrońska B. Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Sci Total Environ*. 2019;695:133913.

- Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol*. 2017;91(3):1049-1130.
- Cadel-Six S, Peyraud-Thomas C, Brient L, de Marsac NT, Rippka R, Méjean A. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(23):7605-7614.
- Cantoral Uriza Enrique Arturo, Asencio Martínez Antonia Dolores, Aboal Sanjurjo Marina. Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica [revista en la Internet]*. 2017;27 (2): 241-251.
- Carmichael WW, Biggs DF, Gorham PR. Toxicology and pharmacological action of anabaena flos-aquae toxin. *Science*. 1975;187(4176):542-544.
- Cerasino L., Salmaso N. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 2012;41(3): 54-63.
- Cevallos-Cedeño RE, Quiñones-Reyes G, Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A, Mercader JV. Rapid Immunochemical Methods for Anatoxin-a Monitoring in Environmental Water Samples. *Anal Chem*. 2022;94(30):10857-10864.
- Christensen VG, Khan E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. *Sci Total Environ*. 2020;736:139515.
- Colas S, Marie B, Lance E, Quiblier C, Tricoire-Leignel H, Mattei C. Anatoxin-a: Overview on a harmful cyanobacterial neurotoxin from the environmental scale to the molecular target. *Environ Res*. 2021;193:110590.
- Devic E, Li D, Dauta A, Henriksen P, Codd GA, Marty JL, Fournier D. Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterases. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(8):4102-4106.
- España Amórtegui JC, Pekar H, Retrato MDC, Persson M, Karlson B, Bergquist J, Zuberovic-Muratovic A. LC-MS/MS Analysis of Cyanotoxins in Bivalve Mollusks-Method Development, Validation and First Evidence of Occurrence of Nodularin in Mussels (*Mytilus edulis*) and Oysters (*Magallana gigas*) from the West Coast of Sweden. *Toxins (Basel)*. 2023 May 11;15(5):329.

- Fayad PB, Roy-Lachapelle A, Duy SV, Prévost M, Sauvé S. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of cyanotoxins in algal blooms. *Toxicon*. 2015;108:167-175.
- Filatova D, Núñez O, Farré M. Ultra-Trace Analysis of Cyanotoxins by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)*. 2020;12(4):247.
- Ha MH, Pflugmacher S. Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon*. 2013;70:1-8.
- Haddad SP, Bobbitt JM, Taylor RB, et al. Determination of microcystins, nodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsin, and saxitoxin in water and fish tissue using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2019;1599:66-74.
- Kaminski A, Bober B, Chrapusta E, Bialczyk J. Phytoremediation of anatoxin-a by aquatic macrophyte *Lemna trisulca* L. *Chemosphere*. 2014;112:305-310.
- Keith D. Hamill. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): First observations in New Zealand, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2001;35:5, 1057-1059.
- Krienitz L, Ballot A, Kotut K, et al. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;43(2):141-148.
- Lahti K, Ahtiainen J, Rapala J, Sivonen K, Niemelä SI. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Lett Appl Microbiol*. 1995;21(2):109-114.
- Li Q., Gu P., Zhang C., Luo X., Zhang H., Zhang J., Zheng Z. Combined toxic effects of anatoxin-a and microcystin-LR on submerged macrophytes and biofilms. *J. Hazard. Mater*. 2020;389:122053.
- Lovin L., Brooks B. Global scanning of anatoxins in aquatic systems: environment and health hazards, and research needs. *Marine and Freshwater Research*. 2020; 71(5): 689-700.
- Mahmood NA, Carmichael WW. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon*. 1986;24(5):425-434.

- Metcalf JS, Tischbein M, Cox PA, Stommel EW. Cyanotoxins and the Nervous System. *Toxins (Basel)*. 2021;13(9):660.
- Nguyen DK, Jang CH. A Simple and Ultrasensitive Colorimetric Biosensor for Anatoxin-a Based on Aptamer and Gold Nanoparticles. *Micromachines (Basel)*. 2021;12(12):1526.
- Oberemm, A., Becker, J., Codd, G.A. and Steinberg, C. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.* 1999; 14: 77-88.
- Oehrle SA, Southwell B, Westrick J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon*. 2010;55(5):965-972.
- Osswald J, Carvalho AP, Guimarães L, Guilhermino L. Toxic effects of pure anatoxin-a on biomarkers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Toxicon*. 2013;70:162-169.
- Osswald J, Rellán S, Carvalho AP, Gago A, Vasconcelos V. Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish-Cyprinus carpio L. *Toxicon*. 2007;49(5):693-698.
- Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int.* 2007;33(8):1070-1089.
- Pawlik-Skowrońska B., Toporowska M., Rechulicz J.. Simultaneous accumulation of anatoxin-a and microcystins in three fish species indigenous to lakes affected by cyanobacterial blooms. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 2012;41(4): 53-65.
- Pedersen JE, Bergqvist CA, Larhammar D. Evolution of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *BMC Evol Biol.* 2019;19(1):38.
- Pekar H, Westerberg E, Bruno O, et al. Fast, rugged and sensitive ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for analysis of cyanotoxins in raw water and drinking water--First findings of anatoxins, cylindrospermopsins and microcystin variants in Swedish source waters and infiltration ponds. *J Chromatogr A*. 2016;1429:265-276.

- Pérez, D. S., Soraci, A. L., & Tapia, M. O. Cianobacterias y cianotoxinas: Rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. 2008; 48-56.
- Pflugmacher S, Jung K, Lundvall L, Neumann S, Peuthert A. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem.* 2006;25(9):2381-2387.
- Pineda-Mendoza Rosa, Martínez-Jerónimo Fernando, Garduño-Solórzano Gloria, Olvera-Ramírez Roxana. Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México. *Polibotánica [revista en la Internet]*. 2011; (31): 31-50.
- Plata-Calzado C, Prieto AI, Cameán AM, Jos A. Toxic Effects Produced by Anatoxin-a under Laboratory Conditions: A Review. *Toxins (Basel)*. 2022;14(12):861.
- Rellán S, Osswald J, Saker M, Gago-Martinez A, Vasconcelos V. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(9):2189-2195.
- Rodríguez I, Fraga M, Alfonso A, et al. Monitoring of freshwater toxins in European environmental waters by using novel multi-detection methods. *Environ Toxicol Chem.* 2017;36(3):645-654.
- Rodríguez V, Yonamine M, Pinto E. Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2006;29(13):2085-2090.
- Romera-García E, Helmus R, Ballesteros-Gómez A, Visser PM. Multi-class determination of intracellular and extracellular cyanotoxins in freshwater samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Chemosphere.* 2021;274:129770.
- Roset J, Aguayo S, Muñoz M. J. *Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión.* *Revista de Toxicología [Internet]*. 2001;18(2):65-71. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91918202>

- Sanchez JA, Otero P, Alfonso A, et al. Detection of anatoxin-a and three analogs in *Anabaena* spp. cultures: new fluorescence polarization assay and toxin profile by LC-MS/MS. *Toxins (Basel)*. 2014;6(2):402-415.
- Soliakov L, Gallagher T, Wonnacott S. Anatoxin-a-evoked [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology*. 1995;34(11):1535-1541.
- Spivak CE, Witkop B, Albuquerque EX. Anatoxin-a: a novel, potent agonist at the nicotinic receptor. *Mol Pharmacol*. 1980;18(3):384-394.
- Stevens DK, Krieger RI. Effect of route of exposure and repeated doses on the acute toxicity in mice of the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-a. *Toxicon*. 1991;29(1):134-138.
- Törökné, A.K., László, E., Chorus, I., Sivonen, K. and Barbosa, F.A.R. Cyanobacterial toxins detected by Thamnotoxkit (a double blind experiment). *Environ. Toxicol*. 2000;15(5): 549-553.
- Tran NH, Li Y, Reinhard M, et al. Quantification of cylindrospermopsin, anatoxin-a and homoanatoxin-a in cyanobacterial bloom freshwater using direct injection/SPE coupled with UPLC-MS/MS. *Sci Total Environ*. 2020;731:139014.
- Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(1):7-60.
- W.F. Vincent. Cyanobacteria. En: Gene E. Likens, editor. *Encyclopedia of Inland Waters*. Academic Press; 2009. p.226-232.
- Wang CC, Petty EE, Smith CM. Rapid and Efficient Analysis of Microcystins, Nodularin, Cylindrospermopsin, and Anatoxin-a in Drinking Water by LC Tandem MS. *JAOAC Int*. 2016;99(6):1565-1571.
- Wood SA, Smith FM, Heath MW, et al. Within-mat variability in anatoxin-a and homoanatoxin-a production among benthic *Phormidium* (cyanobacteria) strains. *Toxins (Basel)*. 2012;4(10):900-912.
- World Health Organization (WHO) *Cyanobacterial Toxins: Anatoxin-a and Analogues*. WHO; Geneva, Switzerland: 2020. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality and Guidelines for safe Recreational Water Environments