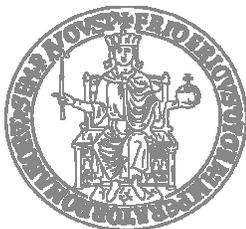


UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÁ DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA IN

“SCIENZA DEL FARMACO”

XVIII CICLO 2002-2005

ANALISI DI BIOTOSSINE MARINE IN MITILI

DEL MAR MEDITERRANEO

E DEI LORO ORGANISMI PRODUTTORI

TUTORE

CH. MO PROF.

ERNESTO FATTORUSSO

CANDIDATA

DOTT.SSA

LUCIANA TARTAGLIONE

INDICE

Capitolo 1

Introduzione..... pag. 5

1.1 Metodi analitici impiegati..... pag. 6

1.1.1 Spettrometria di massa..... pag 6

1.2 Metodi analitici di rivelazione delle biotossine.....pag. 22

1.2.1 Saggi biologici: tossicità sul topopag 23

1.2.2 Saggi strumentali: LC-MS.....pag.25

1.2.3 Riferimenti bibliografici..... pag. 26

Capitolo 2

2.1 Il plancton marino..... pag. 27

2.1.1 Classificazione..... pag. 30

2.1.2 Globalizzazione ed incremento delle proliferazioni
algali..... pag. 32

2.1.3 Conclusioni..... pag. 36

2.1.4 Riferimenti bibliografici..... pag. 37

2.2 Le biotossine marine..... pag. 40

2.2.1 Classificazione..... pag. 44

2.2.2 DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*)..... pag. 45

2.2.3 PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*)..... pag. 60

2.2.4 ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*)..... pag. 65

2.2.5 NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*)..... pag. 68

2.2.6 CIGUATERA-tossine..... pag. 70

2.2.7 Tossine prodotte dai cianobatteri.....pag. 78

2.2.8 Tossine varie.....pag. 86

| | | |
|--------|--------------------------------|----------|
| 2.2.9 | Conclusioni..... | pag. 97 |
| 2.2.10 | Riferimenti bibliografici..... | pag. 100 |

| | | |
|------------|--|-----------------|
| 2.3 | Contaminazione di invertebrati marini..... | pag. 111 |
| 2.3.1 | Procedure di detossificazione degli invertebrati..... |pag 113 |
| 2.3.2 | Le biotossine in Italia..... | pag. 116 |
| 2.3.3 | Tenori massimi delle biotossine algali nei molluschi eduli | pag 120 |
| 2.3.4 | Riferimenti bibliografici..... | pag. 121 |

Capitolo 3

| | |
|--|-----------------|
| Presentazione del lavoro svolto:..... | pag. 123 |
|--|-----------------|

| | | |
|------------|---|-----------------|
| 3.1 | Determinazione dell'acido domoico mediante cromatografia liquida ad interazioni idrofiliche-spettrometria di massa (HILIC-MS)..... | pag. 125 |
| 3.1.1 | Risultati..... | pag. 129 |
| 3.1.2 | Parte sperimentale..... | pag. 142 |
| 3.1.3 | Riferimenti bibliografici..... | pag. 145 |
| 3.2 | Determinazione HILIC-MS di acido domoico in mitili dell'Adriatico..... | pag. 148 |
| 3.2.1 | Risultati..... | pag. 148 |
| 3.2.2 | Parte sperimentale..... | pag. 155 |
| 3.2.3 | Riferimenti bibliografici..... | pag. 157 |

| | | |
|------------|---|----------|
| 3.3 | Rivelazione HILIC-MS della tossicità della nuova specie di diatomea del Golfo di Napoli: la <i>Pseudo-nitzschia galaxiae</i> | pag. 158 |
| | 3.3.1 Risultati..... | pag. 160 |
| | 3.3.2 Parte sperimentale..... | pag. 181 |
| | 3.3.3 Riferimenti bibliografici..... | pag. 188 |
| | | |
| 3.4 | Analisi LC-MS di <i>Alexandrium ostenfeldii</i>: una nuova minaccia nel Mar Adriatico | pag. 192 |
| | 3.4.1 Risultati..... | pag. 195 |
| | 3.4.2 Parte sperimentale..... | pag. 203 |
| | 3.4.3 Riferimenti bibliografici..... | pag. 208 |
| | | |
| 3.5 | Effetto della salinità sulla crescita, produzione e rilascio di yessotossine in <i>Protoceratium reticulatum</i> | pag. 210 |
| | 3.5.1 Risultati..... | pag. 214 |
| | 3.5.2 Parte sperimentale..... | pag. 219 |
| | 3.5.3 Riferimenti bibliografici..... | pag. 222 |
| | | |
| 3.6 | Analisi del dinoflagellato <i>Prorocentrum lima</i> mediante RPLC-MS | pag. 224 |
| | 3.6.1 Risultati..... | pag. 226 |
| | 3.6.2 Parte sperimentale..... | pag. 234 |
| | 3.6.3 Riferimenti bibliografici..... | pag. 237 |

Capitolo 1

Introduzione

La mia tesi di dottorato in “Scienza del Farmaco”, svolta presso il Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell’Università degli Studi di Napoli “Federico II” (Via D. Montesano 49, 80131 Napoli) sotto la supervisione del Prof. Ernesto Fattorusso, verte su:

L’analisi di biotossine marine in mitili del mar Mediterraneo e dei loro organismi produttori.

L’interesse nell’ambito della chimica del mare ha radici profonde, infatti fin dall’antichità l’uomo ha utilizzato cibi prelevati dal mare per l’alimentazione e, ancora oggi questa fonte energetica rappresenta una risorsa di importanza vitale soprattutto per i popoli che abitano regioni costiere. E’ noto come occasionalmente, animali utilizzati a scopo alimentare risultano tossici e talvolta letali per l’uomo e l’occasionalità del fenomeno è un chiaro indizio che le sostanze tossiche non sono prodotte direttamente dall’animale usato come alimento, ma vengono da questi assunte da una fonte esterna ed accumulate in parti specializzate del proprio organismo. Responsabili della contaminazione dei molluschi marini eduli sono metaboliti secondari la cui origine biogenetica è comunque rintracciabile nelle classiche vie biogenetiche quali quelle dell’acido mevalonico, delle acetogenine, dell’acido shikimico e degli amminoacidi¹. In generale i metaboliti secondari, prodotti da organismi marini, contribuiscono all’equilibrio ecologico del mare nel mediare le comunicazioni di tipo chimico tra individui non solo della stessa specie, ma anche di specie diversa. In particolare le sostanze tossiche, assumono, per gli animali e vegetali marini che li producono il ruolo di armi chimiche di difesa contro la predazione

come dimostrato dal fatto che alcuni di questi metaboliti sono stati ritrovati in organismi a basso livello evolutivo che, nonostante la loro scarsa mobilità, sono sopravvissuti all'evoluzione delle specie marine.

I molluschi eduli, incapaci di sintetizzare sostanze in grado di difenderli, riescono quindi a procurarsele tramite l'alimentazione e ad accumularle in parti specializzate del proprio corpo. E' proprio in questo processo di trasferimento di molecole da un organismo all'altro che va ricercata una delle principali cause della periodica o occasionale tossicità dei molluschi marini eduli. La gravità del fenomeno e l'attualità del problema da un punto di vista sia sanitario che economico hanno attirato la mia attenzione e motivato la mia attività di ricerca in merito alle biotossine marine.

1.1 Metodi analitici impiegati

Le tecniche analitiche su cui ho focalizzato la mia attenzione sono state la Spettrometria di Massa e l'accoppiamento cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS).

1.1.1 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

A differenza delle tecniche spettroscopiche, essa è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Una molecola però, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima volatilizzata e ionizzata in una componente dello spettrometro detta sorgente di ionizzazione.

Per ottenere uno spettro di massa, infatti, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati fino a raggiungere una velocità specifica mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore di massa appropriato che separa entità di masse diverse ed infine, rivelare ogni composto dotato di carica e con una certa massa sequenzialmente nel tempo. Ciò si traduce più sinteticamente col dire che in uno spettrometro di massa il campione è prima ionizzato in sorgente; gli ioni risultanti sono poi separati in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) nell'analizzatore. Tutti gli analizzatori di massa richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto.

Mediante la spettrometria di massa è possibile studiare qualsiasi tipo di composto che sia in grado di essere ionizzato, e i cui ioni possano esistere in fase gassosa per cui a seconda della natura delle molecole da analizzare è richiesta una differente sorgente di ionizzazione.

Sorgenti di Ionizzazione

Come già detto il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa.

Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse consentono di analizzare solo ioni positivi, altre invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi. Inoltre alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (TECNICHE HARD), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (TECNICHE SOFT). In base al tipo di sorgente utilizzata, la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

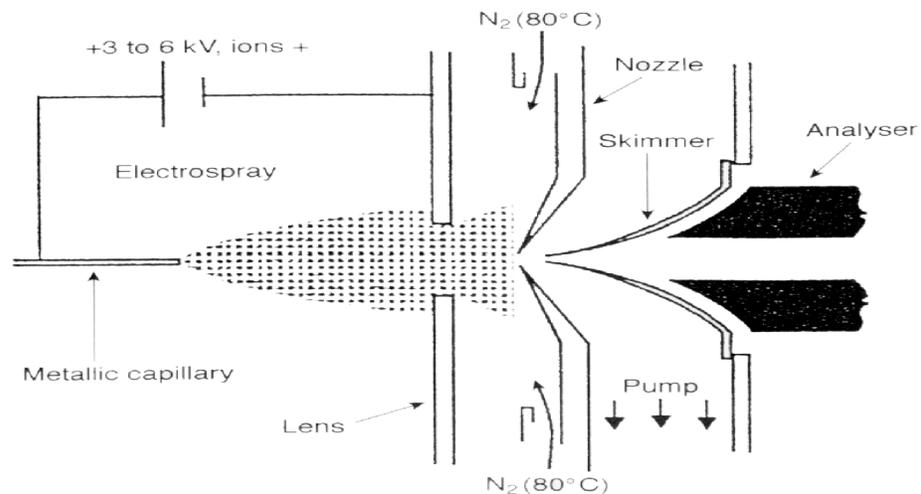
1. Impatto elettronico (E.I.)
2. Ionizzazione chimica (C.I.)
3. Bombardamento con atomi veloci (F.A.B.)
4. Desorbimento con laser (M.A.L.D.I.)
5. Electrospray (E.S.I.)

A seconda della natura chimica della molecola da analizzare una tecnica può essere preferita all'altra. L'insieme delle suddette tecniche è in grado di coprire tutte le esigenze possibili. Gli spettrometri di massa offrono un'ampia gamma di tecniche di ionizzazione realizzabili in quanto le sorgenti sono interconvertibili.

In particolare la struttura chimica delle molecole di cui mi sono occupata ha richiesto l'utilizzo di tecniche di ionizzazione ESI (*Electro Spray Ionization*) e TIS (*Turbo Spry Ionization*).

Ionizzazione Elettrospray (ESI)

L'ESI è una tecnica ampiamente usata per l'analisi di biomolecole idrosolubili, molto polari o addirittura cariche e per realizzare l'accoppiamento tra HPLC e spettrometria di massa. Nella sorgente electrospry il campione è introdotto come soluzione in un solvente volatile (metanolo, acqua, acetonitrile, o loro miscele), contenente una bassa concentrazione di un acido organico debole (acido acetico, acido formico etc.). Tale soluzione viene spinta attraverso un ago capillare, che è caricato ad un elevato potenziale, e uscendo dall'ago va incontro a nebulizzazione cioè formazione di uno spray costituito da microgoccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). La ionizzazione, che si realizza a pressione atmosferica, di solito è spontanea, ma può essere incrementata con l'aggiunta di opportuni reagenti. Nella sorgente il gas (azoto) flussa a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare anche composti termicamente labili. Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della forte densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina "scoppia", creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore. E' possibile ottenere sia ioni positivi (protonati) che ioni negativi (deprotonati) a seconda se l'ago è caricato ad un potenziale positivo o negativo dello stesso ordine di grandezza (KV).



Il risultato finale è uno spettro in cui i picchi principali sono dovuti allo ione molecolare recante una o più cariche (specie multicarica) e a suoi addotti con il solvente o con i sali (Na^+ , K^+ , NH_4^+ nella modalità a ioni positivi e Cl^- , HCOO^- nella modalità a ioni negativi). La presenza di tali addotti è utile da un punto di vista qualitativo nell'identificazione dello ione pseudomolecolare, ma nell'ambito di un'analisi quantitativa la presenza di tali addotti provoca un abbassamento di sensibilità e va perciò evitata.

Analizzatori

L'analizzatore è quel settore dello spettrometro di massa in cui avviene la selezione degli ioni, formati nella sorgente di ionizzazione, sulla base del rapporto m/z . Gli ioni con differente m/z arriveranno al rivelatore in tempi diversi, apparendo nello spettro a valori differenti. Così come per le sorgenti di ionizzazione, la tecnologia in questo settore ha sviluppato vari tipi di analizzatori, dotati di caratteristiche diverse, ma con performance sempre maggiori.

Gli analizzatori possono essere classificati in base al modo in cui effettuano la selezione ionica in:

1. Analizzatori a deflessione magnetica.
2. Analizzatori a quadrupolo
3. Analizzatori a trappola ionica
4. Analizzatori a tempo di volo (TOF)
5. Analizzatori a risonanza ciclotronica ionica (FT ICR)

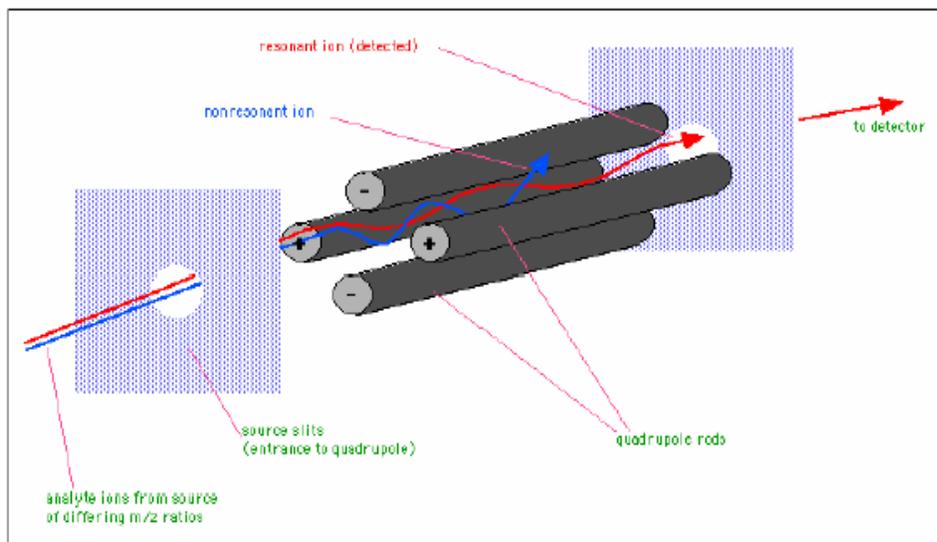
In particolare nel corso delle analisi da me condotte gli analizzatori utilizzati sono stati: analizzatore a triplo quadrupolo e a trappola ionica.

Analizzatore Quadrupolare

Negli strumenti con filtro di massa a quadrupolo, sono impiegate quattro barre. Alle barre opposte del quadrupolo è applicata una differenza di potenziale generata da una corrente continua ed alternata. Gli ioni entrano da un estremità e viaggiano con velocità costante in direzione parallela ai poli (direzione z) ma acquistano, nel loro transito, delle oscillazioni complesse lungo le direzioni x e y a causa di questa applicazione contemporanea ai poli di una tensione a corrente continua (dc) e di una tensione a radiofrequenza (rf).

Esiste un'oscillazione stabile che consente ad un particolare ione di attraversare da un'estremità all'altra il quadrupolo senza entrare in collisione con i poli; questa oscillazione dipende dal rapporto m/z dello ione. Perciò solo ioni con un preciso valore del rapporto m/z attraverseranno in certe condizioni l'intera lunghezza del filtro. Tutti gli altri acquisteranno oscillazioni instabili e

collideranno con i poli perdendosi. La scansione della massa viene condotta variando nel tempo sia rf che dc, mantenendo però costante il loro rapporto.

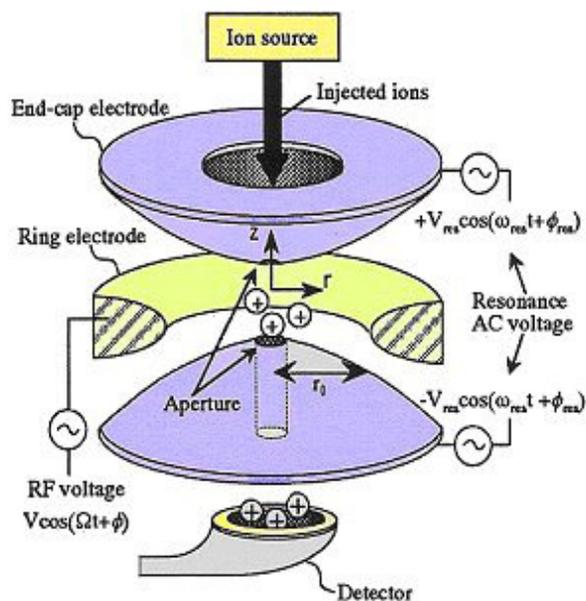


Analizzatore quadrupolare

Analizzatore a Trappola Ionica

Negli analizzatori a trappola ionica le barre del filtro di massa presentano una disposizione sferica. Mentre quindi nel quadrupolo lineare gli ioni selezionati passano direttamente verso il rivelatore, la trappola di ioni trattiene temporaneamente tutti gli ioni, che vengono rilasciati sequenzialmente verso il rivelatore variando il campo elettrico. Quindi è possibile intrappolare per un tempo lungo a piacere gli ioni che provengono dalla sorgente. Una piccola quantità di elio all'interno della trappola aiuta questo processo diminuendo l'energia cinetica degli ioni e facendoli rimanere verso il centro della trappola e lontani dalle pareti. Oltre che "conservare" gli ioni, è possibile, aumentando progressivamente la radiofrequenza, rendere instabili le traiettorie degli ioni a

rapporti m/z via via crescenti, che quindi escono dalla trappola e vanno a colpire il detector.



Analizzatore a Trappola Ionica

In generale le trappole ioniche non raggiungono gli intervalli di massa e l'alta risoluzione di altri strumenti del settore ma sono estremamente versatili, forniscono buona sensibilità ed hanno costi iniziali contenuti.

Su molti degli analiti investigati sono stati eseguiti anche esperimenti di massa/massa (MS/MS). Tali esperimenti vengono realizzati su strumenti dotati di sistema tandem.

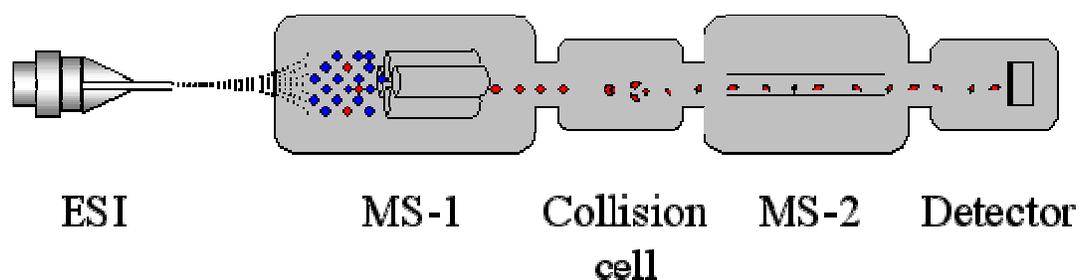
Spettrometria di Massa Tandem

Uno spettrometro di massa tandem è costituito da due analizzatori disposti in serie. Il primo analizzatore (MS1) ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti in uno spettro, lo ione desiderato. Lo ione selezionato (ione

padre, genitore o precursore) viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una cella di collisione, e i frammenti (ioni figli o prodotto), generati dalla dissociazione dello ione molecolare a causa degli urti con il gas di collisione introdotto nella camera, vengono separati dal secondo analizzatore (MS2) in base al loro rapporto m/z .

In questo modo si possono avere informazioni alle volte determinanti per la risoluzione di problemi strutturali.

Strumenti dotati di sistema tandem MS sono i tripli quadrupoli (dove la frammentazione avviene secondo le modalità descritte) e le trappole ioniche dove tutti e tre i suddetti eventi avvengono in un unico luogo, la trappola.



In realtà in questi due tipi diversi di analizzatori si esegue un esperimento spettrometrico Tandem con “progressione nello spazio o nel tempo”.

Progressione nello spazio significa che la selezione dello ione, la sua dissociazione indotta e l’analisi dei frammenti generati avvengono in spazi diversi (cioè in diversi settori dello spettrometro) come si verifica nel triplo quadrupolo.

Progressione nel tempo invece vuol dire che queste operazioni sono fatte nello stesso spazio (l’analizzatore a trappola ionica) ma in tempi successivi. Infatti, nella trappola ionica è possibile inizialmente intrappolare tutti gli ioni presenti nello spettro primario, successivamente isolare lo ione desiderato (espellendo

gli altri dalla trappola), poi indurre la dissociazione dello ione isolato, e infine analizzare i frammenti generati all'interno della stessa trappola. Con un analizzatore a trappola ionica, con lo stesso schema, si può pensare di isolare uno ione figlio e dissociarlo ulteriormente per studiarne la frammentazione. Si ottengono così ioni di seconda generazione che possono essere frammentati a loro volta. Il processo di frammentazione può essere ripetuto n volte e in questi casi si parla di MS^n .

Le informazioni fornite da esperimenti MS/MS o MS^n sono preziose negli studi chimici strutturali per determinare la struttura soprattutto di molecole di grandi dimensioni, e in quelli confirmatori per risolvere miscele complesse di prodotti di cui siano note le modalità di frammentazione.

Gli spettrometri tandem si dicono a geometria ibrida o non ibrida, a seconda che accoppiano due analizzatori diversi o meno. I classici accoppiamenti sono:

- Quadrupolo accoppiato con TOF (Q-TOF)
- Magnetico/TOF
- TOF/TOF
- Quadrupolo accoppiato con trappola ionica (Q-trap)

Interfacciamento LC-MS

L'interfacciamento tra la cromatografia liquida e la spettrometria di massa, è un connubio particolarmente utile nella rivelazione sensibile di composti organici presenti in tracce in matrici complesse. Fino ad una decina d'anni fa

anche solo immaginare tale accoppiamento risultava difficile a causa dell'incompatibilità tra le due tecniche HPLC e Spettrometria di Massa (MS).

HPLC

- Funziona in fase liquida
- Funziona a 25-50°C
- Nessuna limitazione pratica di composti analizzabili
- Nessuna limitazione pratica di peso molecolare
- Utilizza tamponi inorganici

MS

- Funziona in fase gassosa
- Funziona a 100-350°C
- Necessità di campioni di una certa volatilità
- Peso molecolare limitato dall'hardware
- Niente tamponi inorganici

Nel tempo si sono susseguiti una serie di approcci per rendere possibile l'accoppiamento LC-MS ma la tecnica di ionizzazione più convincente è rappresentata dalla *Atmospheric Pressure Ionization* (API) dove la ionizzazione avviene a pressione atmosferica, successivamente gli ioni vengono introdotti nel sistema ad alto vuoto dell'analizzatore di massa guidati da opportuni campi elettrici. L'ESI è una delle molteplici varianti dell'API applicata tra l'uscita di un'unità HPLC e l'ingresso di uno spettrometro di massa. Oltre all'ESI classico in cui la nebulizzazione avviene per semplice repulsione elettrostatica tra le particelle (goccioline) cariche producendo uno spray molto allargato, esiste l'Ion Spray Ionization (ISI) in cui la nebulizzazione viene assistita da un nebulizzatore a gas (aria o azoto) che produce uno spray più direzionale, una maggiore compatibilità con acqua, nonché la possibilità di utilizzare flussi più elevati. Queste caratteristiche rendono particolarmente adatto l'ISI all'accoppiamento con l'HPLC. In ogni caso è spesso utile splittare il flusso proveniente dall'HPLC prima del collegamento alla sorgente, al fine di ottenere un miglioramento del rapporto segnale/rumore, un recupero di parte del

campione senza alterare la sensibilità in quanto l'ESI dipende dalla concentrazione dell'analita e non dalla sua quantità. Infine esiste una tipologia di ESI ad alto flusso (Turbo Ion Spray) che permette di incrementare la velocità di evaporazione del solvente mediante immisione controcorrente di un flusso di aria riscaldata. Questo permette di operare a flussi di anche 1-5ml/min senza necessità di splittare.

Modalità di acquisizione dei dati

Le principali modalità di acquisizione dei dati utilizzati in LC-MS sono:

- *Full scan MS*
- *Product ion scan (MS/MS o MSⁿ)*
- *Selected Ion Monitoring (SIM)*
- *Selected Reaction Monitoring (SRM)*
- *Neutral Loss Scan (NL)*
- *Precursor Ion Scan (PIS)*

Full scan MS

Il *Full Scan MS* è un esperimento di massa in cui l'analizzatore trasmette sequenzialmente al detector tutte le masse, formate nella sorgente, in un range selezionato dall'operatore. Si ottiene così, momento per momento, l'intero spettro di massa di ciò che viene eluito. Il cromatogramma che ne deriva è dato dalla corrente ionica totale (*Total Ion Current*, o TIC) in funzione del tempo di ritenzione. Benché tale modalità di acquisizione fornisca il massimo numero di informazioni qualitative possibile, essa non è tuttavia selettiva qualora si cerchi di rivelare un analita noto all'interno di una miscela molto complessa avendo a

disposizione un analizzatore quadrupolare. Infatti il TIC apparirà in questo caso come un unico insieme irrisolto di picchi sovrapposti. Inoltre, poiché la sensibilità con cui un sistema quadrupolare rivela una data massa è direttamente proporzionale al tempo speso dall'analizzatore su quella massa (*dwell time*), l'acquisizione in modalità *Full Scan* MS è poco idonea alla ricerca e rivelazione di sostanze in tracce.

Nel caso degli analizzatori a trappola ionica, invece gli spettri *full scan* possono essere registrati senza alcuna perdita di sensibilità² Infatti grazie alla funzione di accumulo della trappola, la sensibilità può essere aumentata raccogliendo gli ioni per periodi di tempo più lunghi. Il problema della selettività viene superato estraendo, in fase di processing dei dati, gli ioni interessanti che vengono così rivelati sotto forma di *extracted ion chromatogram* (XIC) o profilo ionico, cioè un grafico dell'intensità di un qualsiasi ione in funzione del tempo. Esso viene estratto (anche in tempo reale) da tutte le scansioni ripetute immagazzinate nel calcolatore.

Selected Ion Monitoring (SIM)

Il SIM è un esperimento di massa a singolo stadio in cui sono monitorati uno o più ioni di particolari rapporti massa/carica. Nella modalità di acquisizione SIM gli ioni formati in sorgente vengono accumulati nell'analizzatore, e di qui solo quelli che presentano il rapporto *m/z* prescelto sono isolati, fuoriescono dall'analizzatore, che funge da filtro e vengono quindi rivelati producendo uno spettro di massa SIM in cui le intensità degli ioni preselezionati sono "continuamente" registrate in funzione del tempo. Nessun dato è acquisito per gli altri ioni che vengono emessi dall'analizzatore. Poiché

solo pochi ioni di selezionati rapporti m/z vengono monitorati, la modalità SIM, in uno strumento a singolo o triplo quadrupolo generalmente fornisce sensibilità più alta della modalità *full scan* MS grazie al fatto che l'analizzatore dedica alla particolare massa selezionata un tempo totale notevolmente superiore rispetto a quanto avviene per la stessa in modalità *Full Scan*; si ottiene quindi un notevole incremento oltre che della sensibilità anche di selettività, a discapito del numero di informazioni ricavabili. La diminuzione del segnale dovuto al rumore di fondo e l'aumento del rapporto segnale/rumore rendono questa modalità di analisi indicata nella rivelazione e soprattutto nella quantificazione di sostanze presenti anche in tracce. L'identificazione di un composto avviene quando:

- Il tempo di ritenzione è lo stesso dello standard puro
- Si innalzano simultaneamente le tracce degli ioni caratteristici prescelti per la registrazione.
- Le aree (le altezze) dei segnali corrispondenti agli ioni caratteristici stanno tra di loro in rapporti uguali, entro i termini delle deviazioni sperimentali, quelli delle abbondanze relative degli ioni dello spettro di massa standard.
- Quando i picchi sono almeno tre volte più grandi del rumore di fondo³.

Generalmente la rivelazione selettiva di un'analita viene effettuata monitorando non un singolo ione bensì più ioni e viene perciò definita *Multiple Ion Monitoring* (MIM)

Product Ion Scan (MS/MS o MSⁿ)

E' una tipologia di esperimento che consiste nell'accoppiamento di due stadi di analisi di massa. Uno ione avente un determinato valore di m/z (ione precursore) viene selezionato ed isolato nel primo stadio di analisi;

successivamente, viene eccitato e frammentato. Nel secondo stadio di analisi, sono acquisiti tutti gli ioni prodotti formati nel range di massa selezionato. Nel caso di un analizzatore quadrupolare la massa selezionata, trasmessa da Q1 viene fatta collidere in una cella di collisione (Q2) con il gas di collisione (N_2), generando caratteristici ioni prodotti. Q3 opera in *Full Scan MS* separando gli ioni in base al rapporto m/z e producendo uno spettro di frammentazione della massa selezionata in Q1.

Selected Reaction Monitoring (SRM)

L'SRM è un esperimento di massa a doppio stadio in cui sono monitorati uno o più set di reazioni, ione precursore > ione frammento. Nella modalità di acquisizione SRM gli ioni formati in sorgente vengono accumulati nel primo analizzatore (primo stadio) e qui vengono isolati solo quegli ioni (definiti ioni precursori) che presentano il rapporto m/z prescelto, mentre gli altri vengono emessi dall'analizzatore e quindi non rivelati. Gli ioni precursori selezionati vengono fatti collidere nel secondo analizzatore con un gas di collisione (argon o azoto) e producono così uno o più ioni prodotti. Gli ioni prodotti vengono accumulati nel terzo analizzatore (secondo stadio), qui vengono isolati e solo quegli ioni prodotti che presentano il rapporto m/z prescelto vengono emessi, producendo uno spettro di massa SRM. Nessun dato è acquisito per gli altri ioni che vengono emessi dall'analizzatore. Come il SIM il *Selected Reaction Monitoring* permette l'analisi rapida di componenti presenti in tracce in miscele complesse, in quanto vengono monitorati solo un numero limitato di ioni prodotti. Infatti, uno ione precursore è selezionato, ma non viene ottenuto l'intero spettro di massa dei suoi ioni prodotti, ma vengono monitorati solo uno

o due ioni prodotto. Di conseguenza, la sensibilità negli esperimenti SRM in uno strumento a triplo quadrupolo è decisamente più elevata che negli esperimenti FS MS/MS. Generalmente viene monitorata più di una transizione ed in questo caso la rivelazione selettiva di più transizioni caratteristiche viene definita *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

Neutral Loss Scan (NL)

In tale esperimento, attuabile con analizzatori a triplo quadrupolo, sia il Q1 che il Q3 lavorano in *Full scan* ma con una differenza costante tra i range di scansione corrispondente al valore di perdita neutra selezionato dall'operatore. Nella cella di collisione (Q2) avviene invece la frammentazione. Lo spettro risultante indica quali ioni frammentandosi perdono una specie neutra uguale alla differenza Q1-Q3. Viene utilizzato nell'analisi specifica di classi di composti che hanno gruppi funzionali o caratteristiche strutturali in comune.

Precursor Ion Scan (PIS)

In tale esperimento, il Q1 lavora in modalità *Full Scan*, il Q2 funge da cella di collisione, mentre il Q3 opera in SIM. Tale esperimento permette di evidenziare la presenza di tutti i composti presenti in una miscela complessa il cui ione molecolare frammenta dando luogo ad un preciso ione frammento, selezionato dall'operatore. Tale esperimento è utile per rivelare composti strutturalmente simili aventi un frammento comune.

1.2 Metodi analitici di rivelazione delle biotossine

Le biotossine marine prodotte da microrganismi acquatici e che possono contaminare le acque dolci, i molluschi eduli e i pesci, rappresentano, per le gravi conseguenze che ne possono derivare, un serio motivo di preoccupazione per la salute sia umana che di altre specie animali.

Le biotossine rappresentano una vera e propria sfida per il chimico analitico interessato alla loro rivelazione a causa dell'estrema varietà strutturale e dell'ampio range di polarità e di pesi molecolari che sono propri di tali composti. Sono perciò richiesti metodi analitici che permettano la rivelazione delle biotossine in una varietà di matrici biologiche e che siano applicabili:

- al monitoraggio delle acque dolci;
- allo screening dei molluschi eduli in acquacultura prima della raccolta;
- a studi di screening, quantitativi, e/o confirmatori dei molluschi eduli e del pesce prima della commercializzazione;
- alle analisi dettagliate a scopo di ricerca per definire il profilo tossico nel plankton e nei molluschi, la produzione di tossine dal plankton, l'assunzione, il metabolismo e l'eliminazione delle tossine dai mitili.

Naturalmente e sfortunatamente non esiste un unico metodo che soddisfi tutte le esigenze.

Generalmente i metodi analitici vengono suddivisi in due gruppi: i saggi biologici e le analisi chimico-strumentali.

I saggi biologici includono il saggio di tossicità sul topo o sul ratto, i saggi in vitro di citotossicità, i saggi biochimici di inibizione della fosfatasi o recettoriali, i saggi immunologici ELISA e RIA. Essi sono rapidi, molto

sensibili e realizzabili a bassi costi, tuttavia non forniscono informazioni quantitative sul contenuto tossico di un campione biologico, sono soggetti a falsi positivi, e, soprattutto, non forniscono informazioni dettagliate sulla natura delle singole sostanze responsabili della tossicità.

E' per questo motivo che sono richiesti metodi strumentali che rispondano a requisiti di sensibilità, precisione e specificità. I metodi analitici strumentali includono la TLC (*Thin Layer Chromatography*), la GC (*Gas Chromatography*), l'LC (*Liquid Chromatography*), la CE (*Capillary electrophoresis*) e la MS (*Mass Spectrometry*). Ne sono stati poi sviluppati altri che prevedono la derivatizzazione delle biotossine con opportuni reagenti e la loro successiva rivelazione (Es. HPLC-FLD con derivatizzatore post-colonna) o altri ancora che prevedono la combinazione di due delle suddette metodiche strumentali (GC-MS, CE-MS e LC-MS).

1.2.1 Saggi biologici: tossicità sul topo

Il monitoraggio della presenza delle biotossine marine nei molluschi eduli è stato eseguito mediante saggi di mortalità sui topi, secondo quanto indicato dalla Gazzetta Ufficiale Italiana³ per le DSP-tossine e le PSP-tossine

Saggio di tossicità sul topo per le DSP-tossine. Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale dell'estratto dell'epatopancreas di molluschi in topi adulti albini di razza Swiss del peso di 18-20 g. La presenza di tossine genera malessere generale e morte. Il saggio viene eseguito su 20 g di epatopancreas (peso sgocciolato) di molluschi, estratti con 100 ml di acetone in

omogeneizzatore e mantenuto per 2 minuti a temperatura ambiente. L'omogeneizzato viene, quindi, filtrato o centrifugato, e estratto altre due volte con 50 ml di acetone ogni volta. I tre estratti riuniti vengono evaporati e il residuo sospeso in 10-15 ml di acqua distillata, che viene infine estratta con 50 ml di etere etilico. L'estratto etero, dopo evaporazione del solvente, è sospeso in 4 ml di una soluzione fisiologica Tween 60 all'1% e inoculato intraperitoneo in tre topi (nella dose di 1 ml per topo), al fine di accertarne la tossicità. Il test è considerato positivo se la morte del topo avviene entro cinque ore dall'iniezione; se, invece, la morte avviene entro 24 ore o non avviene affatto il test risulta negativo, in quanto la quantità di tossine non è considerata rischiosa per il consumatore.

Saggio di tossicità sul topo per le PSP-tossine, Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale dell'estratto dell'epatopancreas di molluschi in topi adulti albinici di razza Swiss del peso di 18-20 g. La presenza di tossine genera paralisi e morte che interviene entro pochi minuti dall'inoculazione. Il saggio viene eseguito su 100-150 g di molluschi (peso sgocciolato), che vengono prima frullati e poi (pesandone 100 g) estratti con 100 ml di HCl 0.1 N. Il pH viene controllato dopo l'estrazione e deve essere inferiore a 4 (preferibilmente intorno a 3). La miscela viene portata all'ebollizione e lasciata bollire per 5 minuti. Si lascia raffreddare e si ricontrolla il pH che dev'essere nel range 2-4 e comunque non superiore a 4.5. Per abbassare il pH si aggiunge HCl 5 N goccia a goccia. Per alzare il pH si aggiunge NaOH 0.1 N goccia a goccia. Si porta a volume (200 ml) con acqua. L'omogeneizzato viene, quindi, centrifugato, e il soprannatante (di cui si controlla nuovamente il pH, viene iniettato intraperitoneo in tre topi (nella dose di 1 ml per topo). Il test è

considerato positivo se la morte del topo avviene entro 5-7 minuti dall'iniezione.

1.2.2 Saggi strumentali: LC-MS

Tra i metodi strumentali utilizzati per la rivelazione delle biotossine un posto di rilievo è occupato dalle tecniche di accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (LC-MS).

L'LC-MS si è dimostrato uno strumento estremamente utile per la determinazione qualitativa e quantitativa delle tossine nel plankton e nei mitili, per l'identificazione di nuove tossine e la ricerca sul metabolismo delle tossine nei molluschi eduli.⁴

Metodi analitici basati sulla combinazione HPLC-MS sono stati sviluppati per le principali classi di biotossine marine: acido domoico e altre ASP tossine, acido okadaico e altre DSP tossine, saxitossina e altre PSP tossine, brevitossina, spirolidi e ciguatossina. E', infatti, questo la sola tecnica che si è dimostrata valida per l'analisi di tutte le tossine e che soddisfa le esigenze sia dei laboratori interessati al monitoraggio che alla ricerca sulle biotossine marine. L'accoppiamento HPLC-Massa fornisce infatti:

- Possibilità di rivelazione universale
- Alta sensibilità, con limiti di rivelazione nell'ordine delle parti per bilione
- Alta selettività e specificità
- Minimo clean-up del campione
- Possibilità di esaminare tossine labili e molto diverse strutturalmente

- Quantificazione accurata e precisa
- Ampio range di risposta lineare
- Possibilità di automazione
- Alta produttività
- Rapidità nella messa a punto di metodi analitici
- Accettabilità legale negli studi confirmatori
- Informazioni strutturali per l'identificazione di nuove tossine, analoghi di tossine note e metaboliti.

L'alto costo iniziale dei sistemi HPLC-MS e la necessità di personale specializzato per l'uso di sistemi HPLC-Massa rappresentano le principali difficoltà per molti laboratori, per quanto recentemente siano stati introdotti strumenti relativamente poco costosi, facili da usare, versatili e di dimensioni ridotte e che così in parte hanno risolto tali problemi.

1.2.3 Riferimenti bibliografici

1. Fattorusso E. *Tossine in alimenti marini* **1993**.
2. Quilliam, M.A.; Hess, P.; Dell'Aversano, C. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Century*, Eds: W.J. deKoe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert and MMM. Sabino, **2001**, pp. 383.
3. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, **18-9-1990**, 218, p. 8..
4. a) Quilliam M. A.; *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Elsevier Science Publ. BV, Amsterdam, **1996**, p 415. b) Quilliam M. A.; *Harmful Algae Proc. VIII International Conference on Harmful Algae*, Vigo Spain, **1997**, p 509.

Capitolo 2

2.1 Il plancton marino

Una delle caratteristiche peculiari degli oceani è la totale assenza, almeno in mare aperto, di vegetali di grandi dimensioni. La massa dei viventi in questo ambiente è costituita da un gran numero di minuscoli vegetali, che si muovono insieme ai loro piccoli erbivori, costituendo il plancton, ovvero esseri viventi che non sono in grado di opporsi al movimento delle correnti, ma si lasciano trasportare da esse da cui ne deriva il nome: dal greco *planktos*, che significa “errante”. Più in particolare il fitoplancton è costituito da microalghe che si possono presentare isolate (forme unicellulari) o raggruppate in piccole colonie di cellule che a seconda delle specie cresce in biomassa aumentando sia in dimensioni che in quantità. Questi organismi, non osservabili direttamente ad occhio nudo, rivestono un ruolo basilare negli ecosistemi acquatici, quello di produttori primari di materia organica, rappresentando così il primo anello della catena alimentare acquatica, ed inoltre producono una grande quantità di ossigeno. La velocità di crescita è legata sia alle specie che alle condizioni ambientali. Le microalghe possono raddoppiare il loro numero in 24 ore se la specie è a crescita rapida o raddoppiare nell’arco di una settimana o ogni 10 giorni se la specie è a crescita lenta. Molte specie fitoplanctoniche hanno la capacità di adattarsi a condizioni sfavorevoli, che si possono presentare nell’ambiente in cui vivono.

L’organismo unicellulare ha la capacità di percepire le variazioni ambientali ed adattarvisi, quindi possiede un sistema di percezione delle fluttuazioni che avvengono nel suo ambiente ed ha la possibilità di reagire. La

maggior parte dei vegetali planctonici, ad eccezione dei dinoflagellate, sono sprovvisti di flagelli e tenderebbero quindi a sedimentare lentamente verso il fondo. Il fluttuare nell'acqua del fitoplancton sarebbe unicamente un movimento di caduta più o meno lento, se non fosse regolato dal peso specifico, dalle resistenze di attrito, e dal movimento attivo dei flagelli. Ciò spiega molte caratteristiche delle alghe planctoniche: la presenza di oli come sostanza di riserva, la formazione di appendici e protuberanze delle pareti cellulari, l'aggregazione di molte cellule in catenelle ed anche l'osservazione che le appendici che favoriscono il galleggiamento sono più grandi nelle acque calde (a viscosità più bassa) che non in quelle fredde. Per contrastare l'effetto della gravità e rimanere nella zona eufotica alcuni organismi fitoplanctonici dispongono di strutture che riducono il loro peso specifico e favoriscono il loro galleggiamento.

La proliferazione di alghe nel plancton, definita *algal bloom*, è un fenomeno che si verifica periodicamente e in diverse parti del mondo in concomitanza di particolari eventi climatici e ambientali, tra cui il fenomeno dell'upwelling, che consiste nel verificarsi di correnti ascensionali di masse d'acqua, ricche di nutrienti rappresentando la causa principale delle "acque colorate" in tutto il mondo¹. La densità cellulare può essere così alta che le acque diventano in alcuni casi rosse (da cui il termine "maree rosse") ma anche verdi o marroni. In particolare vengono definiti come "harmful algal bloom" i fenomeni associati alla proliferazione di alghe tossiche e/o dannose^{2,3} che possono diventare una seria minaccia per l'uomo. Infatti le microalghe oltre che per pesci erbivori, rappresentano la principale fonte di nutrimento, per quegli organismi che si alimentano per filtrazione delle acque del mare, quali ostriche,

mitili, pettini e bivalvi in genere. Tali organismi attraverso la loro attività di “filter-feeding” accumulano le fitotossine nei loro tessuti commestibili quando le fioriture di tali specie tossiche, appaiono inaspettatamente in aree dove i mitili sono coltivati⁴⁻⁶.

Questi ultimi sono tra gli alimenti marini più consumati in tutto il mondo e in caso di proliferazione algale tossica, finiscono per rappresentare quell’anello della catena alimentare responsabile del trasferimento della tossicità dal plancton all’uomo. Uno dei primi incidenti riportati di avvelenamento conseguente all’ingestione di molluschi bivalvi contaminati a causa di proliferazioni algali risale al 1793, quando il Capitano George Vancouver approdò nella Columbia britannica, e molti uomini del suo equipaggio morirono in seguito a paralisi e soffocamento dopo aver ingerito frutti di mare raccolti in una zona oggi conosciuta come “Poison Cove”. Il Capitano, in seguito, osservò come gli aborigeni considerassero pericoloso mangiare molluschi quando l’acqua del mare appariva “colorata”. Solo molti anni dopo le sostanze responsabili di tale contaminazione furono identificate e denominate PSP dall’inglese *paralytic shellfish poisoning*, alcaloidi così potenti che una quantità di circa 500 µg, facilmente accumulabile in soli 100 gr di molluschi, può rivelarsi fatale per l’uomo. Da allora, molti episodi simili sono stati registrati nel Nord America e nel mondo intero fino ai giorni d’oggi in cui, oltre 2000 casi di avvelenamento umano (fatali nel 15% dei casi), sono annualmente registrati in tutto il globo in seguito a consumo di pesci o molluschi⁷. Appare evidente come tali fenomeni producano in primo luogo danni dal punto di vista igienico-sanitario all’intera popolazione e in secondo luogo economici all’industria ittica, agli allevatori di molluschi e ai pescatori i

quali sono costretti, a causa della riduzione sia del consumo di alimenti marini nonchè della loro esportazione, a bloccare la propria attività con conseguenti severe perdite economiche durante tutto il periodo di durata della tossicità.

2.1.1 Classificazione

Per il fitoplankton, vale a dire l'insieme di piante microscopiche che vivono nell'oceano e convertono composti inorganici in complessi composti organici non esiste una stima definitiva del numero totale delle specie, dal momento che di volta in volta ne vengono scoperte di nuove. Attualmente si conoscono circa 10000 specie, suddivise in cinque grosse classi:

- *Chlorophyta* (alghe verdi)
- *Chrysophita* (alghe gialle e diatomee)
- *Pyrrophyta* (dinoflagellati)
- *Euglenophyta*
- *Cyanophyta* (alghe blu-verdi o cianobatteri)

Delle suddette specie di fitoplankton marino,⁸ circa 300 sono attualmente ritenute responsabili delle caratteristiche colorazioni rossicce della superficie del mare, definite maree rosse, e soltanto ad una trentina di specie è riconosciuta la capacità di produrre metaboliti secondari tossici chiamati “fitotossine”, sostanze che per ingestione di alimenti marini contaminati, possono giungere all'uomo. Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle diatomee e dei dinoflagellati. Gli altri taxa sono molto meno rappresentati, sia quantitativamente che qualitativamente, e la loro presenza è legata a condizioni particolari: così ad esempio, le silicoflagellate si

osservano nei mesi più freddi, le coccolitoforidee sono per lo più pelagiche, le cloroficee e le euglenoficee prediligono condizioni estuariali.

Le fioriture algali tossiche, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate in⁹:

a) Fioriture di specie che provocano soltanto una colorazione dell'acqua con diminuzione della visibilità e della qualità estetica e che sono in grado di crescere a tal punto da causare eventualmente morie di pesci e di invertebrati acquatici in seguito a deplezione di ossigeno. Appartengono a questo gruppo soprattutto specie di dinoflagellati: *Gonyaulax polygramma*, *Noctiluca scintillans*, *Srippsiella trochoidea* e di diatomee : *Skeletonema costatum*.

b) Fioriture di specie che producono potenti tossine, che possono giungere all'uomo attraverso la catena alimentare, provocando una varietà di danni gastrointestinali e neurologici. Le tossine sono così classificate:

- PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) prodotte da dinoflagellati appartenenti alle classi *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium*, nonché da alcuni cianobatteri.
- DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*), prodotte da dinoflagellati appartenenti alle classi *Dinophysis*, *Prorocentrum* e *Protoceratium*.
- ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*), biosintetizzate da alcune diatomee, quali, ad esempio, *Pseudo-nitzschia multiseriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. australis*, etc.
- CIGUATERA-tossine, prodotte dal dinoflagellato *Gambierdiscus toxicus* e *Ostreopsis spp.*
- Tossine prodotte dai Cianobatteri, quali l'*Anabaena circinalis*, la *Microcystis aeruginosa*, la *Nodularia spumigena*, etc.

c) Fioriture di specie che nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo, ma dannose in vario modo per pesci e invertebrati, come, ad esempio la diatomea *Chaetoceros convolutus*, il dinoflagellato *Gymnodinium mikimotoi*, il primnesiofita *Prymnesium parvum* ed il rafidofita *Chattonella antiqua*.

d) Fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa: tossine NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*), prodotte dal dinoflagellato *Gymnodinium breve*.

2.1.2 Globalizzazione ed incremento delle proliferazioni algali

Seppure le proliferazioni di alghe rischiose per gli uomini sono state, fin dall'antichità, un fenomeno del tutto naturale, negli ultimi decenni se ne è registrato un considerevole incremento in frequenza, intensità e distribuzione geografica¹⁰⁻¹². Ad esempio, le fioriture dei dinoflagellati *Alexandrium tamarense* e *Alexandrium catenella* fino al 1970 avvenivano soltanto nelle acque temperate dell'Europa, del Nord America e del Giappone⁸; mentre dal 1990 in poi si sono estese anche nell'emisfero meridionale e quindi nelle acque del Sud Africa, Australia, Nuova Zelanda, India e Filippine.

L'incremento del numero di segnalazioni di fioriture algali, e il conseguente incremento dei casi d'intossicazioni alimentari, sembra essere dovuto a diverse concause:

a) L'aumento dei fenomeni d'eutrofizzazione delle acque. Il fenomeno dell'eutrofizzazione marina costiera è il risultato dell'arricchimento dei nutrienti (essenzialmente nitrati e fosfati) presenti nelle acque. Tale fenomeno è spiegato sia sulla base di cause naturali che antropogeniche¹³. La principale caratteristica

che distingue i due tipi di eutrofizzazione è il tempo di comparsa. Infatti, l'eutrofizzazione naturale è un processo a lungo termine che rientra in una scala del tempo di 1.000-10.000 anni. L'eutrofizzazione antropogenica, che avviene più frequentemente nelle aree costiere per apporto di sostanze eutrofizzanti, quali fosfati e nitrati ad opera dell'uomo, si manifesta in tempi molto brevi, in una scala temporale di circa 10 anni. Tali sostanze eutrofizzanti sono altamente nutritive per le alghe, le quali, in loro presenza, si accrescono a dismisura producendo, per fotosintesi clorofilliana, grandi quantità di ossigeno. Subito dopo la morte, le alghe sono attaccate da batteri aerobi che le ossidano, liberando anidride carbonica. La quantità di ossigeno consumata dai batteri è più elevata se c'è molta sostanza organica da decomporre. In questo modo si crea nell'acqua una notevole diminuzione dell'ossigeno e ciò compromette la vita degli animali, soprattutto nei bacini chiusi come i laghi e nei mari poco profondi e privi di correnti come l'Adriatico.

Il primo e più importante indice di valutazione dei fenomeni di eutrofizzazione naturale e antropogenica è dato dall'osservazione delle caratteristiche visibili dell'acqua: un'anormale crescita di macroalghe e/o aumento nella biomassa del fitoplancton, determina il fenomeno che viene indicato con il termine di «acqua colorata» e «red tide» come visto in precedenza. Nelle coste europee le «acque colorate» sono dovute ad «exceptional algal blooms» (fioriture eccezionali di alghe con più di 10⁶ cellule/litro e di 50 mg/m³ di clorofilla), mentre vi sono anche «blooms seasonal» (fioriture stagionali) che non determinano fenomeni visibili in quanto sono dovute a specie di alghe unicellulari che non superano 10³ cellule/litro d'acqua. Ma, se talune specie di microrganismi planctonici non sono influenzati

dall'arricchimento in nutrienti delle acque costiere, come il *Gymnodinium breve* e l'*Alexandrium*, molte altre specie sembrano essere stimolate nella crescita dagli scarichi domestici, industriali e agricoli. Il significativo aumento delle fioriture del *Phaeocystis pouchetii*, che per la prima volta è apparso nelle acque tedesche nel 1978 è probabilmente l'esempio meglio conosciuto di questo fenomeno.¹⁴

Per i pericoli che possono derivare dai fenomeni di eutrofizzazione delle acque, Hong-Kong, il Giappone e diverse nazioni europee hanno deciso di ridurre gli scarichi di fosfati e di nitrati almeno del 50% nei prossimi anni: simili sforzi, tuttavia, finiscono per risultare vani, se rimangono iniziative isolate e se, cioè, i paesi vicini continuano ad inquinare le acque marine.

b) L'aumentata conoscenza scientifica di specie tossiche. Le notizie di proliferazioni algali, associate ai danni sulla salute degli uomini e sugli allevamenti di molluschi e pesci occupano uno spazio via via crescente sulle pagine dei quotidiani, nei programmi televisivi e nella letteratura scientifica. Quindi, c'è un numero sempre maggiore di ricercatori che sorvegliano le acque marine, tenendo sotto controllo la proliferazione delle specie tossiche. Un buon esempio è rappresentato dall'*Alexandrium minutum*, che, noto fino al 1988 soltanto in Egitto¹⁵, è stato ora ritrovato anche in Australia, Irlanda, Francia, Spagna, Portogallo, Italia, Turchia, Thailandia, Nuova Zelanda e Giappone¹⁶⁻¹⁷.

Con l'incremento, inoltre, dei problemi connessi alla pesca indiscriminata nelle acque costiere, molte nazioni stanno valutando i vantaggi degli allevamenti di pesci e molluschi. Queste attività, attraverso un controllo più rigoroso delle acque, portano di conseguenza alla luce la presenza di specie tossiche mai ritrovate in passato. Infatti, un po' dovunque si moltiplicano le

comunicazioni scientifiche e sanitarie riguardanti tossine appartenenti alla classe delle PSP, DSP, NSP e ASP. D'altro canto, gli allevamenti di pesci focalizzano l'attenzione su specie planctoniche, che possono causare seri danni ai delicati tessuti delle branchie¹⁸⁻²⁰.

c) Le deforestazioni e l'eccessivo sfruttamento dell'entroterra. Anche l'antropizzazione delle aree costiere ed in particolare il progressivo aumento dell'immissione nell'ambiente marino di effluenti urbani, industriali, agricoli e zootecnici contribuiscono allo sviluppo di alghe tossiche marine o generare variazioni delle specie planctoniche. In Svezia, ad esempio, evidenze sperimentali indicano che le acque fluviali drenate dai terreni agricoli ricchi in azoto e fosforo stimolano la proliferazioni di certi cianobatteri, mentre le acque provenienti dalle foreste favoriscono la crescita di tutt'altre specie come il *Prorocentrum minimum*.²¹

d) Le variazioni climatiche. E' opinione comune presso le comunità scientifiche che anche l'effetto-serra e il riscaldamento degli oceani favoriscono lo sviluppo di particolari microalghe, come pure la migrazione di specie da certe aree geografiche verso nuove zone. Ad esempio, alcuni fossili testimoniano come i progenitori del dinoflagellato *Pyrodinium bahamense*, attualmente tipico solo di alcune aree tropicali, abbiano avuto in passato una distribuzione geografica ben più ampia; come, d'altro canto, non è escluso che il *Pyrodinium* nel prossimo futuro possa tornare a proliferare, ad esempio, nelle acque dell'Australia, che già un tempo colonizzava.²² Sono state, inoltre, osservate grosse coincidenze tra la proliferazione del *Pyrodinium* nelle Filippine e in Indonesia con eventi climatici particolari, quali l'ENSO (El Nino-Southern Oscillation).²³ Il forte evento ENSO verificatosi tra il 1991 e il 1994 e

l'incremento di fioriture di dinoflagellati nello stesso periodo tendono a confermare tale ipotesi.

e) Vettori occasionali di microalghe da un'area geografica all'altra

Infine, anche le acque di zavorra delle navi vanno considerate dei probabili vettori di plancton marino da una parte all'altra del globo insieme alle chiglie delle navi. Tale problema è apparso in tutta la sua gravità negli anni '80, quando alcuni dinoflagellati tossici non indigeni sono stati introdotti nelle aree di allevamento di mitili presenti lungo le coste australiane, con disastrose conseguenze economiche.²⁴ Al fine di ridurre i rischi associati al trasporto di specie pericolose attraverso le acque delle navi, il 1° novembre 1991 l'Organizzazione Marittima Internazionale ha ratificato alcune linee di condotta, attualmente ancora facoltative, quali il divieto di imbarcare acqua durante la fioritura di specie tossiche all'interno dei porti, o la possibilità di trattare le acque di zavorra con calore, shock elettrici o con agenti chimici (Cl₂, H₂O₂ etc.).²⁵

2.1.3 Conclusioni

Attualmente, il campo della ricerca sulle specie tossiche si sta arricchendo del contributo di studiosi via via sempre più numerosi, dal momento che le ripercussioni sulla salute pubblica e sull'economia del problema delle microalghe tossiche stanno assumendo le forme di una vera e propria emergenza mondiale.

Non c'è dubbio che il crescente interesse nell'utilizzo delle acque costiere per gli allevamenti di pesci e di molluschi stia conducendo ad una maggiore conoscenza scientifica delle specie tossiche delle alghe.

Le nazioni, che vantano sia l'assenza di intossicazioni da alimenti marini che di inquinamento delle acque costiere, stanno concentrando i loro sforzi per impedire l'introduzione, anche non intenzionale, di specie tossiche non-indigene di alghe marine.

E' di notevole importanza, inoltre, che quanti si interessano del controllo delle acque costiere siano coscienti che un aumento di nutrienti, provenienti da attività agricole o di deforestazioni, potrebbe tradursi in un aumento di specie planctoniche tossiche. Infine, gli studi sulle variazioni climatologiche (El Nino, effetto-serra, deplezione dell'ozono) possono fornire indicazioni circa la variazione o l'aumento di alghe tossiche nel mare.

Un buon numero, comunque, di programmi internazionali si propongono attualmente di studiare e di gestire in modo adeguato le fioriture di alghe nocive e le loro ripercussioni non solo sull'ambiente, ma anche sull'economia e sulla salute degli uomini.

2.1.4 Riferimenti bibliografici

1. Ade, P.; Funari, E.; Poletti, R.; *Ann Ist Super Sanità* **2003**, 39(1), p. 53.
2. Anderson D.M. *Le Scienze*, **1994**, 314, p.74.
3. Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (Ed.) *Manual on harmful marine microalgae*. Paris : UNESCO **1995**
4. Anderson D.M., *Sci. Am.* **1994**, 271 , p 52.
5. Anderson D.M., *Nature*, **1997**, 338, p.513.
6. Yasumoto T., Murata M., *Chem. Rev.*,**1993**, 93, p1897.
7. Dale B.; Yentsch C. M.; *Oceanus* **1978**, 21, p. 41.

8. Sournia A., Chretiennot-Dinet M. J., Ricard M. J. *Plancton Res.* **1991**, *13*, p. 1093.
9. *Manual on harmful marine microalgae*, UNESCO, **1995**.
10. Anderson D.M., Okaichi T., Remoto T., (ed.). *Red tides: biology, enviromental science and technology*. New york. Elsevier Science Publishing Co.; **1989**, p. 11.
11. Coper E.M., Carpenter E.J., Bricelj V.M., (ed.). *Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms*. Berlin; Springer Verlag; **1989**, p. 449.
12. Hallegraeff G.M., *Phycologia*, **1993**, *32*, p. 77.
13. *Eutrophication in the Mediterranean Sea*, UNESCO, **1988**.
14. Lancelot C., Billens G., Sournia A., Weisse T., Colijn F., Veldhuis M., Davies A., Wassman P.; *Ambio* **1987**, *16*, p. 38.
15. Halim, Y. *Vie et Milieu* **1960**, *11*, p. 102.
16. Hallegraeff G. M., Bolch C. J., Blackburn S. I., Oshima Y.; *Bot. Mar.* **1991**, *34*, p. 575.
17. Yuki K.; *Jap. J. Phycol.* **1994**, *42*, p. 425.
18. Bell G. R.; *Nature* **1961**, *192*, p. 279.
19. Rensel, J. E. In: T. J. Smayda & Y. Shimizu (eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea.. Developments in Marine Biology*, **1993**, *3*, p. 625.
20. Yang C. Z., Albright L. J.; *Diseases Aquat. Organism* **1992**, *14*, p. 105.
21. Graneli E., Moreira M. O.; *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1960**, *136*, p.89.
22. McMinn A.; *Micropaleontology* **1989**, *35*, p. 1.
23. Maclean J. L.; *Mar. Poll. Bull.* **1989**, *20*, p. 304.

24. Hallegraeff G. M., Bolch, C. J.; *J. Plankton Res.* **1992**, *14*, p. 1067.
25. Bolch C. J., Hallegraeff G. M.; *J. Mar. Env. Eng.* **1993**, *1*, p. 23.

2.2 Le biotossine marine

Si definisce tossina una sostanza capace di indurre manifestazioni fisiologiche dannose negli organismi viventi, anche se ingerita in quantità esigue. Una tossina, per risultare tale, deve possedere i seguenti requisiti introdotti dalla teoria di Vogt¹:

- a) Presenza in animali, piante, batteri etc.;
- b) Estraneità nei confronti dell'organismo vittima;
- c) Effetto tossico riconosciuto sul benessere o sulla vita dell'organismo vittima.

Spesso a tossine di origine marina sono stati attribuiti dei nomi di fantasia (saxitossina, tetrodotossina), ma il principio generale nella scelta del nome di una sostanza tossica prevede che il nome dell'organismo in cui è stata rilevata preceda il suffisso tossina. Applicando tale principio di denominazione, tuttavia, bisogna prestare attenzione a quegli organismi in cui sono state riscontrate più tossine, al fine di evitare confusioni.

Tra le specie animali viventi (circa 1.000.000), almeno 500.000 vivono in ambienti acquatici, un numero questo destinato ad aumentare con l'esplorazione dei fondali marini. Degli animali marini alcune migliaia di specie sono ritenute tossiche, ma di queste solo una piccola percentuale è stata studiata; infatti, attualmente non sono più di un centinaio le tossine marine, di cui siano conosciute con esattezza la struttura chimica e la loro azione farmacologica sugli organismi viventi.

La conoscenza fino ad ora acquisita in merito alle biotossine, inoltre induce ad inserirle nella categoria dei così detti *metaboliti secondari*, in quanto

non sono fondamentali per il metabolismo basale dell'organismo che le produce.

E' da precisare che nella categoria dei metaboliti secondari si inseriscono tutti quei composti che non hanno ancora un ruolo conosciuto o che non sono indispensabili per la sopravvivenza dell'organismo che li produce ma comunque apportano dei benefici. I metaboliti secondari sono presenti spesso in piccole quantità e regolano generalmente le interazioni, degli organismi, con l'ambiente e con altri organismi, comunicazioni chimiche, stimoli per la riproduzione. La varietà degli ipotetici ruoli attribuiti ai metaboliti secondari include quello di regolatore ormonale e dei canali degli ioni, nonché attivatori delle risposte cellulari². Per quanto attiene il ruolo biologico delle tossine, è ormai opinione comune che esse abbiano una funzione specifica soprattutto nell'ambito della cattura delle prede e in quello della difesa. Infatti, alcune tossine ritrovate nelle spine o nella pelle di alcuni pesci hanno un chiaro ruolo difensivo da più grossi predatori: è stato notato, infatti, come alcuni pesci carnivori rilascino, immediatamente dopo averli addentati, quei pesci che spongono delle tossine sulla propria pelle.

E' stato anche osservato che le tossine prodotte da alcune specie di coralli e di spugne hanno una funzione protettiva non solo contro i predatori, ma anche contro le larve di alcuni animali sessili, che potrebbero fissarsi alle spugne o ai coralli stessi, compromettendone l'esatto svolgimento delle funzioni biologiche.

Alcune tossine marine, inoltre, sembrano avere un significato fisiologico per molti organismi. I pesci che effettuano lunghe migrazioni, per esempio, contengono, come principali lipidi, esteri di cere invece dei più comuni gliceridi; i pesci anziani accumulano grosse percentuali di vitamina A nei loro

stomaci; altri pesci accumulano all'interno delle proprie uova tossine che, verosimilmente, hanno un ruolo importante nello sviluppo embrionale.

E' comunque ancora prematuro concludere che una biotossina agisca solo ed esclusivamente come un meccanismo di difesa chimico contro potenziali competitori per le risorse in natura, ma è anche difficile accettare che un sistema di biosintesi possa evolversi senza un apparente significato funzionale dato che una via biosintetica richiede il ruolo coordinato di una serie di enzimi e geni regolatori senza considerare la spesa energetica che ne deriva. Per le alghe marine, infatti è stato ipotizzato un ulteriore intervento delle biotossine nel mantenimento dell'equilibrio fisiologico dell'organismo; sembra infatti che alcune di queste molecole ricoprano un ruolo importante nella sintesi di acidi nucleici, mentre altre intervengano nella sintesi della parete cellulare³

Nell'ambito di studi biogenetici, le tossine marine sono state spesso marcate, al fine di valutare se esse fossero di derivazione endogena o esogena.⁴ E' opinione comune che il gruppo di tossine endogene è costituito da molecole di natura proteica, in quanto risulta difficile pensare che delle proteine siano accumulate nell'organismo di tanti animali, senza subire alcuna modificazione. Queste tossine, come gli esteri della colina nelle ghiandole salivari dei gastropodi, le ictiotossine e le tossine secrete dalla pelle, vengono comunemente riscontrate in particolari tessuti, senza che vi siano variazioni di sorta tra organismi appartenenti alla stessa specie o che vivono in differenti aree geografiche.

Una tossina viene invece considerata esogena quando improvvisamente o periodicamente e solo in alcune aree geografiche fa la sua comparsa in organismi marini, che vengono di solito ingeriti senza provocare alcun danno

alla salute, ed è proprio in tale ambito (tossine non proteiche) che ritroviamo le tossine prodotte dalle microalghe, che sono tra le più potenti tossine sino ad oggi conosciute.

Le biotossine marine prodotte dalle microalghe del fitoplancton e da batteri possono determinare estese mortalità di invertebrati e di pesci, oltre che ritrovarsi, seguendo specifiche catene trofiche, in animali marini che rappresentano alimenti per l'uomo. E' infatti risaputo, che alcuni animali marini filtratori che si nutrono di plancton (molluschi bivalvi appartenenti ai generi *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Mytilus*, *Pecten*, *Saxidomus* e *Spisula*), accumulano nei propri apparati digerenti le sostanze tossiche rilasciate nell'acqua dagli organismi produttori, senza esserne affetti. Tali animali infatti sono sessili, non hanno capacità di migrare e si nutrono filtrando l'acqua del mare; assumono quindi le tossine prodotte dal fitoplancton presente nelle loro immediate vicinanze attraverso la catena alimentare e le concentrano nelle proprie ghiandole digestive. I molluschi sono dunque dei buoni indicatori del grado di contaminazione delle acque da parte di specie microalgali tossiche.

Una sostanza tossica assunta attraverso la dieta ed accumulata nelle ghiandole digestive dei molluschi può essere in alternativa metabolizzata in una forma non tossica, rapidamente escreta o accumularsi intatta in concentrazione tale da trasformare tali animali nell'anello della catena alimentare responsabile della trasmissione della tossicità all'uomo determinando così l'insorgenza di quadri clinici patologici che sono indicati con il termine di biointossicazioni.

Secondo le attuali conoscenze, le biointossicazioni sono sindromi cliniche che si distinguono da quadri patologici dovuti ai comuni e noti virus e batteri

degli alimenti, ai contaminanti radioattivi, agli inquinanti conservativi, ai parassiti e ad allergie da consumo di prodotti della pesca⁵.

Ogni anno nel mondo si registrano almeno 2000 casi di biointossicazioni alimentari dovute al consumo di molluschi contaminati; infatti quello delle biotossine è nato inizialmente come problema sanitario con i conseguenti costi sociali dovuti alle degenze ospedaliere, alle giornate lavorative perse ed ai possibili casi letali. Invece, su scala finanziaria più ampia, il problema colpisce soprattutto l'industria della pesca nelle aree in cui si verifica il fenomeno della tossicità, in quanto, è necessario un periodo di interdizione dalla raccolta ed il ritiro dalla commercializzazione delle specie vettrici della tossicità. Ulteriori costi, che ricadono non solo sui produttori, sono quelli derivanti dall'indispensabile attività di monitoraggio nelle zone in cui tali fenomeni si presentano con una certa periodicità.

Inoltre esistono grosse differenze tra pesci e animali sessili: un'area in cui convivono pesci tossici e organismi non tossici può non essere considerata un'area tossica. D'altro canto, quando dei molluschi eduli presentano tossicità, diventando così non commestibili si afferma che l'area circostante è tossica.

2.2.1 Classificazione

Le fitotossine accumulate dai molluschi eduli esercitano un particolare fascino per i chimici a causa della loro struttura atipica, per la loro natura tossica e per la loro storia. Esse hanno alcune delle strutture più complesse conosciute in natura, con pesi molecolari da molto bassi a molto alti, e possono essere da molto polari ad altamente lipofile. Presentano caratteristiche multifunzionali, un elevato grado di chiralità, e producono effetti tossici molto diversi ed a tal

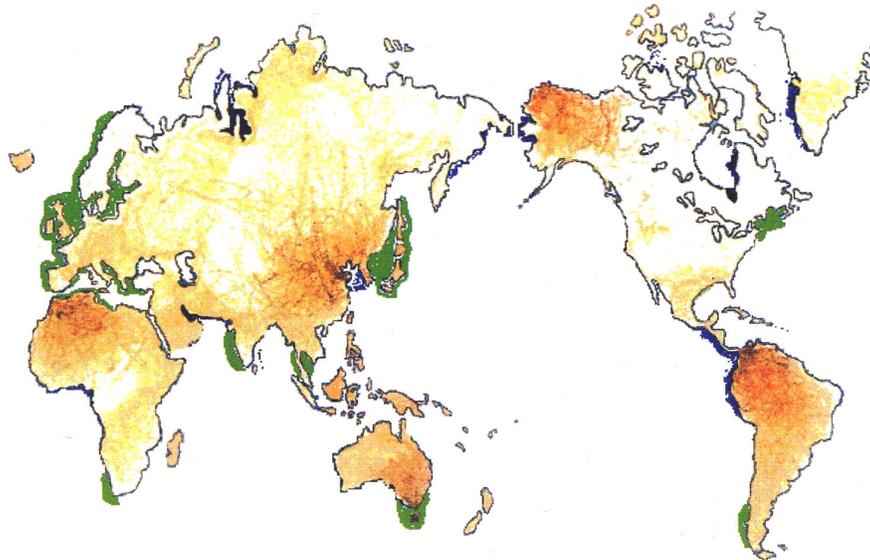
proposito sono denominate e classificate in base agli effetti farmacologici in DSP, PSP, ASP, NSP e CIGUATERA-tossine. Un gruppo a parte per farmacologia e chimica è rappresentato dalle tossine prodotte dai cianobatteri. Esistono, tuttavia, anche altre biotossine marine che non sono ascrivibili a nessuna delle suddette classi, ma non per questo sono meno pericolose e diffuse: la palitossina, la tetrodotossina, la neosurugatossina e la prosurugatossina, e due gruppi di composti di recentissima scoperta, gli azaspiracidi e gli spirolidi.

2.2.2 DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*)

L'avvelenamento diarroico da molluschi indicato con la sigla DSP è una sindrome associata ad una varietà di tossine polieteree prodotte da dinoflagellati e accumulate da molluschi eduli, quali mitili, pettini, ostriche e bivalvi in genere.

L'intossicazione, in genere, si manifesta con diarrea, nausea e mal di stomaco, sintomi che scompaiono entro circa tre giorni senza seri effetti prolungati. Nonostante, i sintomi nell'immediato siano relativamente lievi e poco preoccupanti, alcune delle DSP tossine sono dotate di una potente attività *tumor promoting*⁶ e rappresentano quindi a lungo termine un rischio piuttosto grave per la salute umana.

Avvelenamenti da DSP tossine sono segnalati praticamente in tutto il mondo, ma sono più frequenti in Giappone e in Europa, dove le coltivazioni di molluschi sono molto diffuse.



Distribuzione di DSP nel mondo.

I primi casi di disordini gastrointestinali associati al consumo di mitili che a loro volta si erano nutriti di dinoflagellati hanno avuto luogo in Olanda negli anni '60 e sono stati riportati da Kat *et al.*⁷ Tuttavia, l'indagine scientifica su questo tipo di avvelenamento è iniziata nel 1978, quando Yasumoto *et al.*⁸ associarono le frequenti gastroenteriti, che avevano luogo nelle regioni nord-orientali del Giappone dopo ingestione di molluschi raccolti in primavera inoltrata e in estate, non alla presenza di batteri patogeni, ma a tossine solubili in acetone e presenti nelle ghiandole digestive dei molluschi stessi. Benché nel periodo in cui la tossicità si manifestava non fossero state registrate maree rosse, la variazione regionale e stagionale della tossicità ne suggerì l'origine planctonica. Questa ipotesi fu successivamente confermata da analisi delle popolazioni planctoniche delle aree contaminate e dei molluschi e da analisi chimiche molto sofisticate condotte sui dinoflagellati raccolti. Fu così individuato il dinoflagellato *Dinophysis fortii* come l'organismo produttore della tossina responsabile della tossicità dei molluschi, denominata di conseguenza dinofisistossina (DTX-1); fu anche osservato che i molluschi eduli

divenivano tossici anche in presenza di una densità cellulare bassissima di dinoflagellato (200 cellule per litro).

In tale occasione, per la prima volta, la sindrome fu descritta come avvelenamento diarretico da molluschi e indicata con la sigla DSP.⁹

Successivamente, avvelenamenti da DSP tossine sono stati riconosciuti in tutto il mondo e numerosi composti polieterei sono stati indicati come gli agenti responsabili della tossicità.

Attualmente, le DSP tossine includono tre gruppi di composti piuttosto diversi per struttura chimica, meccanismi d'azione, alterazioni biochimiche ed organismi produttori:

- Tossine acide:Acido Okadaico (OA) e Dinofisistossine (DTXs)
- Tossine neutre:Pectenotossine (PTXs)
- Yessotossine (YTXs)

Un quadro piuttosto completo della distribuzione geografica delle DSP è mostrato nella seguente tabella.

| TOSSINA | MOLLUSCHI | AREA |
|----------------------|--------------|-----------------------|
| Acido Okadaico | mitili | Olanda |
| | mitili | Francia |
| | mitili | Svezia |
| | mitili | Spagna |
| | mitili | Norvegia |
| | mitili | Italia (Adriatico) |
| Dinofisistossina 1 | mitili | Giappone |
| | mitili | Norvegia |
| | pettini | Giappone |
| Dinofisistossina 2 | mitili | Irlanda |
| Dinofisistossina 3 | pettini | Giappone |
| Pectenotossine 1 e 6 | pettini | Giappone |
| | Yessotossina | pettini |
| | mitili | Norvegia |
| | mitili | Italia (Adriatico) |

Acido okadaico (OA) e dinofisistossine (DTXs). L'acido okadaico è un derivato polietereo di un acido grasso a 38 atomi di carbonio, che è stato isolato per la prima volta dalla spugna marina *Halichondria okadaii*,¹⁰ in seguito dalle colture di dinoflagellati *Prorocentrum lima*¹¹ e *P. Concavum*¹² ed infine dalle cellule di *Dinophysis spp.*¹³

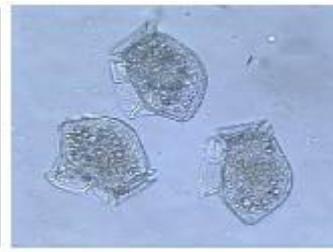
Suoi derivati sono la DTX 1 (acido 35-(*R*)-metilokadaico),¹⁴ prodotta dal *Dinophysis fortii* e dal *D. acuminata*, la DTX 2 (acido 31-demetil-35-metilokadaico)¹⁵ prodotta dal *D. acuta*, e la DTX 3 (acido 7-*O*-acil-35-(*R*)-metilokadaico35)¹⁶ che sembra essere invece un prodotto del metabolismo dei molluschi.



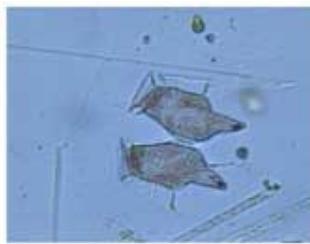
Dinophysis fortii



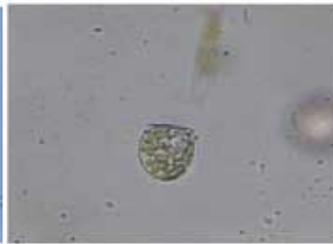
Dinophysis sacculus



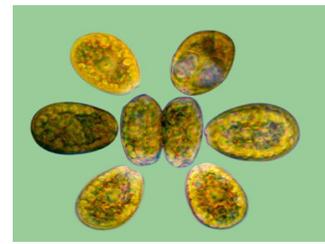
Dinophysis acuta



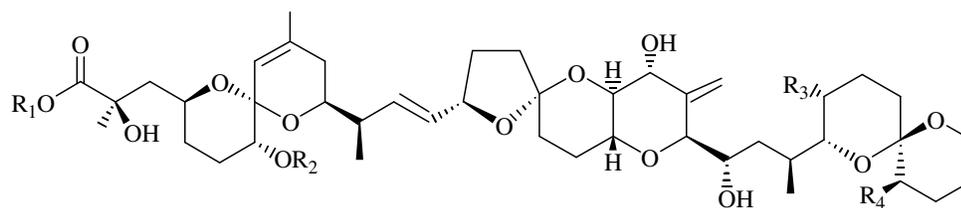
Dinophysis caudata



Dinophysis rotundata



Prorocentrum lima



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|----------------------------|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Acido okadaico (OA) | H | H | CH ₃ | H |
| DTX 1 | H | H | CH ₃ | CH ₃ |
| DTX 2 | H | H | H | CH ₃ |
| DTX 3 | H | COCH ₃ | H | CH ₃ |

L'iniezione intraperitoneale nel topo di tali tossine provoca mortalità per le seguenti dosi (mg/kg)¹⁷:

- OA 0,20
- DTX1 0,16
- DTX2 0,20
- DTX3 0,25

Recenti studi effettuati su colture del *P. lima* hanno evidenziato la presenza di numerosi esteri al carbossile.

Da campioni biologici diversi dai molluschi sono stati isolati anche l'acido 2-deossi okadaico, l'acido 7-deossi okadaico, l'acido 14,15-deidrokadaico, l'acido 9-10 episolfurokadaico, gli esteri dell'acido okadaico e la DTX 4, ma la loro inclusione nella classe delle DSP è ancora da confermare.

Lo studio dell'origine di queste tossine non è comunque agevole, in quanto i *Dinophysis* non sono organismi coltivabili in laboratorio. Pertanto la loro tossigenicità è stata dimostrata, individuando le tossine in campioni di cellule prelevate in mare aperto. Tale sistema di prelievo consente chiaramente l'isolamento di quantità minime di tossine, che possono essere identificate soltanto mediante sistemi di analisi chimica molto sofisticati.

Sebbene la struttura dell'acido okadaico e delle DTXs ricordi molto quella dei macrolidi prodotti dagli streptomiceti e dai funghi, la loro origine biosintetica sembra essere molto diversa. Yasumoto *et al.*, infatti, somministrando acetato marcato con ^{13}C a colture di *P. lima*, hanno isolato acido okadaico e un macrolide, il proocentrolide, in cui i carboni marcati erano in posizioni non spiegabili in base al semplice processo di condensazione di unità di acetato. Il prodotto osservato suggerisce che la formazione della catena carboniosa include delle unità dicarbossiliche.

La diarrogenicità dell'acido okadaico e dei suoi derivati è stata dimostrata per la prima volta da Harnano nel 1986; successivamente Terao ha provato che la DTX 1 causa notevoli danni alla mucosa intestinale.

Nell'ambito di studi sul meccanismo d'azione dell'acido okadaico, è stato evidenziato che l'OA provoca contrazioni di lunga durata della muscolatura liscia vascolare senza l'intervento di neurotrasmettitori; infatti né l'adrenalina né l'acetilcolina influenzano l'azione dell'acido okadaico.¹⁸

Più recentemente è stato anche dimostrato che l'acido okadaico e le DTXs sono dei potenti *tumor-promoters*¹⁹. *Tumor promotion* e *tumor promoter* sono espressioni usate nella carcinogenesi chimica, concetto ora accettato come operante nella formazione di tumori in vari organi dell'uomo. Essa si articola in

due stadi: uno di inizio ed uno di sviluppo e promozione del tumore.²⁰ Agenti che iniziano la carcinogenesi sono quelli in grado di indurre un danno irreversibile al DNA. Agenti che invece sviluppano la carcinogenesi in una cellula già attaccata dal carcinogeno sono detti "tumor promoters".²¹ Il trattamento di tessuti con un iniziatore, seguito da ripetute applicazioni di un "tumor promoter" genera tumori con altissima probabilità. Un "tumor promoter" od un iniziatore da soli, invece, non producono alcun tumore.

Il primo *tumor promoter* ad essere stato studiato è stato il TPA (20-tetradecanoilforbol-3-acetato), un terpenoide isolato da Euforbiaceae.²² Successivamente diversi altri *tumor promoters* sono stati individuati e studiati.

Nel 1988, l'acido okadaico e la DTX 1 sono stati per la prima volta indicati come responsabili della promozione del tumore sulla pelle di ratto.²³ In seguito è stato anche riportato che l'acido okadaico disciolto nell'acqua induce la formazione di tumori nello stomaco di ratto.²⁴

Recentemente, è stato proposto il seguente meccanismo d'azione per l'acido okadaico e i suoi derivati. Si tratta di una inattivazione della funzione del gene soppressore di tumore, non, come generalmente avviene, attraverso una cancellazione o una mutazione, ma attraverso inibizione di alcune fosfatasi e conseguente iperfosforilazione, soprattutto a livello di residui di serina e di treonina, del *tumor suppressor gene product*. A tale azione consegue un accumulo di proteine fosforilate, che sono poi coinvolte nella promozione del tumore.

Sueoka e Fujiki hanno studiato a lungo il meccanismo d'azione dell'acido okadaico, e sono giunti alla conclusione che il TNF- α , una citochina infiammatoria, si comporta nell'organismo umano anche da *tumor promoter*.

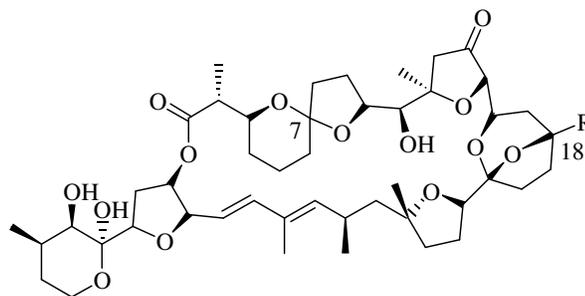
Inoltre, sia il TPA che l'acido okadaico favoriscono, in seguito ad applicazioni locali, l'espressione dell'mRNA del TNF- α nella pelle di topo; così come l'acido okadaico ne favorisce l'espressione anche nelle ghiandole gastriche dopo assunzione per via orale. Si presume, quindi, che esista una nuova modalità di promozione di tumori, mediata dal TNF- α .

Da quando l'acido okadaico è stato indicato come inibitore delle fosfatasi, sono stati condotti numerosi studi biochimici e farmacologici, e attualmente tutte le attività biologiche di questa tossina sono collegate all'inibizione delle fosfatasi. Secondo la classificazione di Cohen esistono diversi gruppi di fosfatasi; e l'acido okadaico inibisce la PP2A a concentrazioni molto basse (K_i di 30 pM), la PP1 a concentrazioni leggermente più alte, la PP2B a concentrazioni piuttosto elevate, mentre non produce nessun effetto sulla PP2C.

Diversi gruppi di ricerca hanno anche compiuto degli studi sulla relazione struttura-attività dell'acido okadaico.²⁵ I dati raccolti mostrano come un'alterazione del C-1 carbossilico o del gruppo OH in 24 determini una forte riduzione dell'attività. Altre modifiche strutturali, come l'idrogenazione del doppio legame in posizione 14 o la riduzione del C-2, determinano comunque riduzione dell'attività, probabilmente perchè alterano la conformazione pseudociclica della molecola stessa, dovuta essenzialmente all'interazione tra il carbonio carbossilico e l'ossidrile in 24.

C'è infine da notare che l'acido okadaico, la DTX 1 e la DTX 2 esercitano come tali la propria attività farmacologica, la DTX 3 invece per inibire la fosfatasi PP2A deve essere prima idrolizzata a DTX 1 da un enzima digestivo, la lipasi.

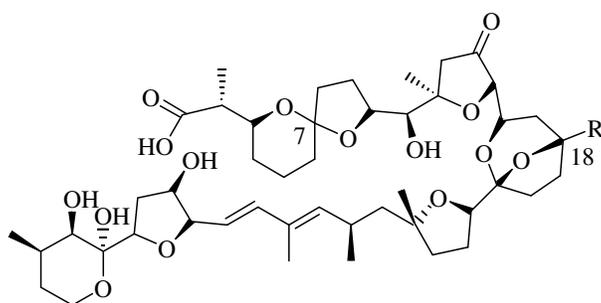
Pectenotossine (PTXs). La pectenotossina 1 è stata isolata per la prima volta dai pettini *Patinopecten yessoensis*, raccolti nelle regioni nord-orientali del Giappone.²⁶ La struttura polieterea caratterizzata dalla presenza di una funzione lattonica è stata delucidata attraverso estese analisi di cristallografia ai raggi X.²⁷ Esistono diversi omologhi della PTX 1, che presentano tutti i diversi stadi di ossidazione del sostituente in posizione 18 da metile ad acido carbossilico: la PTX 2 presenta un metile; la PTX 1, la PTX 4 e la PTX5 un idrossimetile; la PTX 3 un formile, la PTX 6 e la PTX 7 una funzione carbossilica.



| | R | C-7 |
|--------------|--------------------|-----------|
| PTX 1 | CH ₂ OH | R |
| PTX 2 | CH ₃ | R |
| PTX 3 | CHO | R |
| PTX 4 | CH ₂ OH | S |
| PTX 5 | CH ₂ OH | OH @ C-14 |
| PTX 6 | COOH | R |
| PTX 7 | COOH | S |

Sono stati identificati numerosi analoghi delle pectenotossine, ma bisogna tener presente che riarrangiamenti degli spirocomposti avvengono con relativa facilità in condizioni acide, per cui l'elevato numero di analoghi delle PTXs potrebbe essere dovuto ad artefatti di laboratorio.

L'origine delle pectenotossine, è attribuita al *Dinophysis fortii*, che produce la PTX 2 e al *Dinophysis acuta* che sintetizza l'acido secoico, un lattone idrolizzato della PTX 2. La PTX2 è ritenuta il precursore delle altre pectenotossine attraverso processi di botrasformazione ad opera dei bivalvi.



| | |
|----------------------|----------|
| | C-7 |
| PTX2 sa | <i>R</i> |
| 7-epi-PTX 2sa | <i>S</i> |

Sono riportate le seguenti tossicità delle PTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg¹⁷:

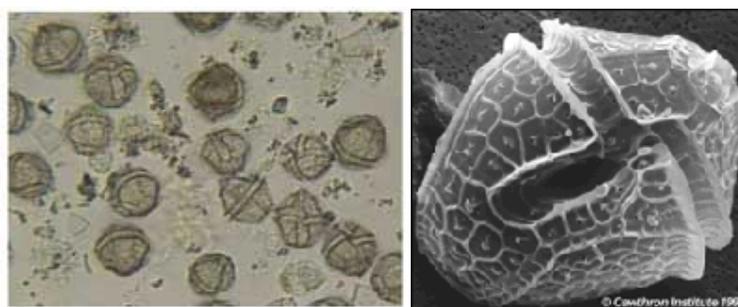
- ◆ PTX1 0,25
- ◆ PTX2 0,23
- ◆ PTX3 0,35
- ◆ PTX4 0,77
- ◆ PTX6 0,50
- ◆ PTX7 >5,0
- ◆ PTX8 >5,0
- ◆ PTX9 >5,0

Le pectenotossine vengono incluse nella classe delle DSP-tossine, ma non molto è noto sulla loro tossicità. Studi compiuti su molecole purificate hanno messo in evidenza una forte epatotossicità, dovuta a una rapida necrosi degli epatociti. Inoltre, l'azione patologica delle pectenotossine è stata correlata a quella della falloidina,²⁸ che causa anche seri danni alle cellule dello stomaco mediante rilascio di ioni potassio e enzimi litici.

Non esistono evidenze sperimentali sull'eventuale azione di promozione dei tumori delle pectenotossine.

Yessotossine (YTXs). La yessotossina²⁹⁻³⁰ è un polietere costituito da 11 anelli eterici *trans*-fusi, una catena terminale a 9 atomi di carbonio e due gruppi alcolici solfatati. E' stata isolata per la prima volta dai pettini e la sua origine è rimasta per lungo tempo piuttosto oscura. Solo recentemente sono stati individuati gli organismi produttori della YTX nei dinoflagellati *Protoceratium reticulatum*³¹ e *Lingulodinium polyedrum*³²⁻

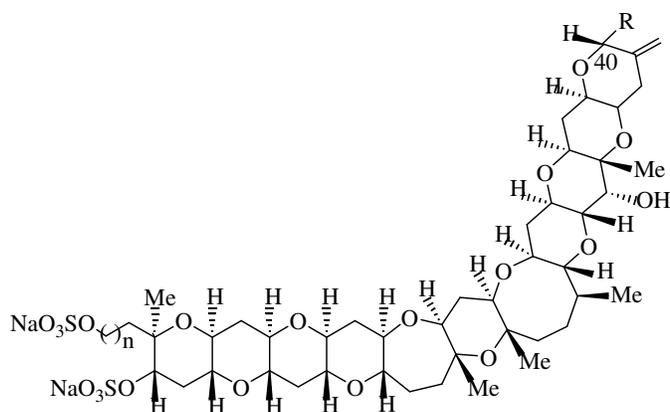
33



Lingulodinium polyedrum

Protoceratium reticulatum

Esistono analoghi della yessotossina che presentano modifiche nella catena laterale della porzione orientale della molecola.



| | R | n |
|---------------------------|---|--------|
| YTX | | 1 |
| OmoYTX | | 2 |
| 45-OHYTX | | 1 |
| 45-OHomoYTX | | 2 |
| CarbossiYTX | | 1 |
| CarbossiomoYTX | | 2 |
| NoroxoYTX | | 1 |
| NoroxomoYTX | | 2 |
| 1-DesulfoYTX | | 1 (OH) |
| 45,46,47-TrinorYTX | | 1 |

Altri derivati, invece, presentano un metilene in più nella catena laterale della porzione occidentale della molecola e sono definiti omoyessotossine. Mentre la 45-OHYTX, la 45-OHomoYTX, la 45,46,47-trinorYTX, la 1-desulfoYTX sono stati isolati in tutto il mondo,³⁴ la noroxomoYTX, l'adriatossina, la carbossiYTX ed il suo omoderivato sono stati isolati e caratterizzati proprio dal nostro gruppo di ricerca da *Mytilus galloprovincialis*³⁵

e per ora sembrano essere tipici dei mitili del Mar Adriatico. Recentemente alla famiglia delle YTXs si sono aggiunti numerosi analoghi isolati e caratterizzati da colture cellulari di *Protoceratium reticulatum* e da *Mytilus galloprovincialis*. L'inclusione delle YTXs nella classe delle DSP è una questione tuttora controversa, poiché queste tossine non provocano disturbi gastrontestinali e diarrea e sono molto meno tossiche rispetto all'acido okadaico e alla DTX 1, quando somministrate per via orale, in quantità di 1 mg/Kg. Tuttavia iniettate per via intra-peritoneale su topi maschi del peso di circa 20 gr presentano una tossicità ben più elevata delle altre DSP tossine. Infatti, la dose letale 50 (DL50) della YTX si aggira intorno ai 100 µg/Kg, laddove quella dell'acido okadaico è circa 192 µg/Kg e quella della PTX 2 260 µg/Kg. Prima, però, di poter concludere che la yessotossina non è coinvolta in avvelenamenti di tipo alimentare, per la trascurabile tossicità per via orale, sono necessari ulteriori ed approfonditi studi istopatologici.³⁶ Analisi istologiche hanno dimostrato che uno degli organi bersaglio della YTX è senz'altro il cuore, dove sono stati evidenziati edemi e numerosi punti necrotici. Le yessotossine sono letali per il topo per iniezione intraperitoneale ma in maniera differente in relazione alla struttura molecolare come mostrato dai valori delle DL50 espresse in mg/kg di seguito riportate¹⁷:

| | |
|----------------|-------|
| ➤ YTX | 0,10 |
| ➤ 45-OHYTX | 0,50 |
| ➤ 1-desulfoYTX | 0,50 |
| ➤ omoYTX | 0,10 |
| ➤ 45-OHomoYTX | 0,50 |
| ➤ norYTX | 0,22 |
| ➤ ATX | >0,10 |
| ➤ carbossiYTX | 0,50 |

Le discrepanze tossicologiche che mostrano le yessotossine somministrate al topo per via intraperitoneale e per via orale potrebbero essere dovute al fatto che i gruppi solfati ne riducono l'assorbimento nel tratto digestivo. Il Not Observed Adverse Effect Level (NOAEL) ricavato dal topo per somministrazione orale di YTX è stimato in 1000 µg/Kg su parte edibile. Applicando a questo un fattore di 100, per estrapolare dati ottenuti dalla sperimentazione animale e riportarli all'uomo, si ottiene un valore di tossicità acuta di 10 µg/Kg su parte edule. Per verificare se le yessotossine potevano avere effetti citotossici, in seguito a somministrazione intraperitoneale di yessotossina sul topo sono stati osservati i possibili effetti su cellule di tessuti di diversi organi tra cui intestino, stomaco, fegato e cuore. All'osservazione con microscopia ottica ed elettronica si è visto che ne la yessotossina ne i derivati provocano evidenti danni permanenti all'epitelio gastrointestinale o lesioni epatiche. Invece si sono riscontrate lievi alterazioni morfologiche al livello delle cellule del miocardio riscontrabili solo al microscopio elettronico. Inoltre studi recenti³⁷ hanno dimostrato che la yessotossina e l'acido okadaico possono intervenire nel ciclo cellulare di cellule di mammifero promovendo dei processi apoptotici. L'apoptosi o morte cellulare programmata è un complesso processo che permette, a una cellula e in seguito a un gruppo di cellule, di autodistruggersi bloccando i meccanismi di replicazione cellulare. L'apoptosi è la manifestazione fenotipica di un'informazione genetica che viene espressa solo in certe situazioni come l'esposizione della cellula a elementi nocivi oppure durante la trasformazione o il differenziamento di un tessuto. La cellula in fase apoptotica manifesta dei cambiamenti morfologici e molecolari, e proprio analizzando tali cambiamenti manifestati da cellule di mammifero in coltura

esposte a YTX (potenziale della membrana mitocondriale e la concentrazione totale di acido nucleico che presentano valori diversi in cellule normali e in cellule apoptotiche) è stato possibile dimostrare l'induzione di apoptosi.

La yessotossina contribuisce a scatenare la morte cellulare perché sembra poter attivare delle proteasi della famiglia delle *caspasi* in particolare la *caspasi* 2. Si ottiene lo stesso risultato somministrando acido okadaico ma l'effetto citotossico indotto da yessotossina è provocato da dosi più basse e avvengono in tempi più brevi che con l'acido okadaico. Comunque il meccanismo attraverso il quale yessotossina e acido okadaico attivano la *caspasi* non è ancora stato dimostrato³⁸.

Considerando poi la forte somiglianza strutturale con le brevetossine, si ipotizza che la yessotossina agisca a livello del sistema nervoso, comportandosi da agente depolarizzante e favorendo quindi un forte afflusso di ioni sodio all'interno della cellula. Tale somiglianza con le brevetossine fa pensare anche ad una possibile attività ittiotossica; ma dopo aver esposto dei pesci a una soluzione di 1 ppm e di 0.5 ppm di yessotossina, nessuno di essi è morto nell'arco delle 24 ore.²⁵

La presenza di due gruppi solfato nella molecola suggerisce una possibile attività emolitica, come nel caso dell'anfidinolide e della maitotossina; ma alla concentrazione di 50 ppm non è stata registrata nessuna emolisi.³⁶

Studi antimicrobici hanno evidenziato una forte inibizione della crescita di funghi e di lieviti ma non di batteri; la potenza della yessotossina (10-50 µg/disco) è comparabile a quella della anfotericina B³⁶.

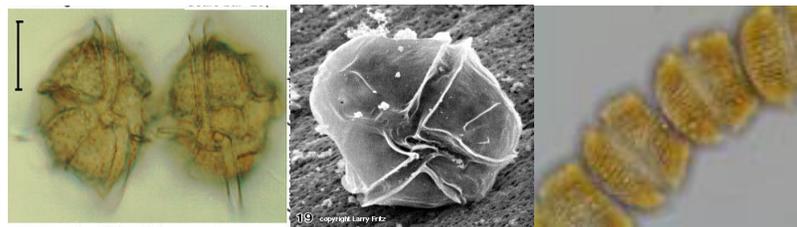
Sulla YTX, sono stati anche eseguiti esami tesi a valutare la sua capacità di inibire la fosfatasi PP2A e le proprietà citotossiche: i risultati di tali ricerche

mostrano che rispetto all'acido okadaico la IC_{50} relativa alla PP2A della YTX è di 0.36 mg/ml; la potenza inibente della yessotossina è, dunque, inferiore di circa quattro ordini di grandezza rispetto a quella dell'acido okadaico. Per quanto riguarda poi l'attività citotossica su epatociti, questa è risultata tre volte inferiore rispetto a quella dell'acido okadaico.³⁶

Analizzando, dunque, le proprietà farmacologiche della yessotossina e confrontandole con quelle dell'acido okadaico e delle DTX sembra piuttosto azzardato il suo inserimento nella classe delle DSP-tossine. Studi tossicologici tesi a chiarire la sua attività all'interno dell'organismo umano sono assolutamente necessari ma fortemente condizionati dalla scarsa disponibilità di campioni purificati e proprio a tale scopo durante il triennio di dottorato ho messo a punto una procedura di isolamento e purificazione della YTX da colture cellulari.

2.2.3 PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*)

Le PSP sono potenti neurotossine prodotte da dinoflagellati appartenenti a tre generi: *Alexandrium* (*A. catenella*, *A. tamarensis*, *A. acatenella*, *A. minutum* etc.), *Pyrodinium* (*P. phoneus*, *P. bahamense* var. *compressa*, etc.), e *Gymnodinium* (*G. catenatum*).

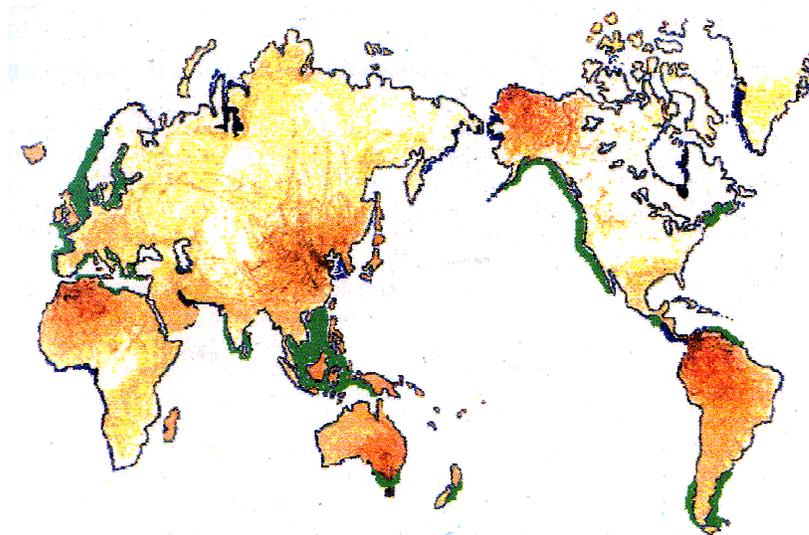


P. bahamense

A. tamarensis

G. catenatum

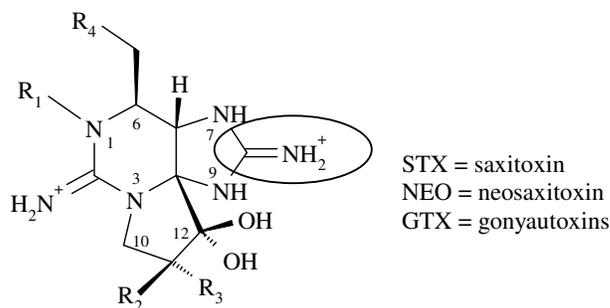
Cellule di questi organismi e le tossine da loro prodotte vengono accumulate nelle ghiandole digestive dei mitili coltivati e non, rendendoli periodicamente non commestibili con gravi conseguenze per l'uomo sia da un punto di vista igienico sanitario che economico. D'altra parte anche cianobatteri che proliferano nelle acque dolci quali *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, e *Lyngbya sp.* producono PSP tossine in associazione con altre neurotossine (anatossina-a e anatossina-as) e epatotossine (cilindrospermopsina e microcistine). Numerosi casi di intossicazioni talvolta letali di animali e persone conseguenti all'ingestione di acque contaminate vengono ogni anno riportati in tutto il mondo. I sintomi dell'intossicazione alimentare umana chiamata avvelenamento paralitico da molluschi compaiono nell'uomo molto rapidamente, circa 30 min. dopo l'ingestione del materiale contaminato, e includono: parestesia dapprima ristretta al volto e che poi si estende rapidamente alle dita; si sviluppa in seguito un torpore generale accompagnato da capogiro, atassia e intorpidimento muscolare.



Distribuzione di PSP tossine nel mondo

Forti dosi inibiscono la respirazione e la morte interviene per asfissia tra le 2 e le 24 ore dall'ingestione del materiale contaminato a seconda dell'entità della dose.³⁹ Non esiste alcun antidoto noto e la sola cura consiste nel tenere il paziente in respirazione artificiale finché le tossine non vengono metabolizzate ed escrete. Il massimo livello tollerabile di saxitossina corrisponde a circa 80 µg per 100 g di molluschi. Infatti il capostipite di tale classe di tossine è la saxitossina (STX) che per la prima volta fu isolata dal mollusco *Saxidomus giganteus* raccolto in zone costiere dell'Alaska dove mantiene livelli di tossicità durante tutto l'anno.⁴⁰

Da un punto di vista chimico-strutturale le PSP tossine sono derivati tetraidropurinici formati da due unità guanidiniche fuse attraverso un legame azachetalico stabile e possono essere divise in tre gruppi sulla base della molecola modello della saxitossina:⁴¹ derivati carbamoilici, N-sulfocarbamoilici e decarbamoilici. Le tossine carbamoiliche sono i principali costituenti presenti nei molluschi bivalvi (*Mytilus edulis* e *Saxidomus giganteus*), mentre i composti N-sulfocarbamoilici rappresentano il gruppo dominante nelle cellule dei dinoflagellati.^{42,43} In tutti i casi si tratta di composti idrosolubili, resistenti al calore, stabili in ambiente acido ma non in quello alcalino.⁴⁴



| R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | Carbamate toxins | N-Sulfocarbamoyl toxins | Decarbamoyl toxins -OH |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| H | H | H | — | 1 STX | 11 GTX5, B1 | 17 dcSTX |
| OH | H | H | — | 2 NEO | 12 GTX6, B2 | 18 dcNEO |
| H | H | OSO ₃ ⁻ | — | 3 GTX2 | 13 C1 | 19 dcGTX2 |
| H | OSO ₃ ⁻ | H | — | 4 GTX3 | 14 C2 | 20 dcGTX3 |
| OH | H | OSO ₃ ⁻ | — | 5 GTX1 | 15 C3 | 21 dcGTX1 |
| OH | OSO ₃ ⁻ | H | — | 6 GTX4 | 16 C4 | 22 dcGTX4 |
| H | H | OH | — | 7 11αOH-STX | | 23 11αOH-dcSTX |
| H | OH | H | — | 8 11β OH-STX | | 24 11β OH-dcSTX |
| OH | H | OH | — | 9 11αOH-NEO | | 25 11αOH-dcNEO |
| OH | OH | H | — | 10 11βOH NEO | | 26 11βOH dcNEO |

Un'ulteriore distinzione tra le PSP tossine viene fatta in base allo stato di carica: la saxitossina, la neosaxitossina e i loro derivati decarbamoilati e ossidrilati sono bicarichi positivamente, le gonyautossine (GTX1-6) ed i loro derivati decarbamoilati (dcGTX1-4) sono monocariche positivamente e le tossine del gruppo C sono neutre. Infine tra le tossine del gruppo NEO e quelle del gruppo STX esiste una differenza nei pKa delle funzioni guanidiniche: la funzione guanidinica al C-2 presenta un pKa = 11.5 nei derivati della STX e un pKa = 6.75 nei derivati della NEO; la funzione guanidinica al C-8 presenta un pKa = 8.24 nei derivati della STX e un pKa = 8.65 in quelli della NEO.

La tossicità delle PSP si realizza attraverso un blocco reversibile dei canali voltaggio-dipendenti del sodio di tutte le cellule eccitabili mediato da uno dei due gruppi guanidinici (inserito nel cerchio).

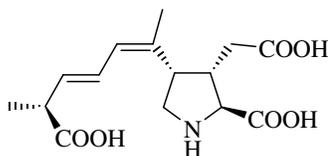
Conseguentemente al legame di tali tossine con un recettore localizzato sulla superficie esterna di tali canali, il flusso passivo di ioni Na^+ verso l'interno della cellula è impedito e la formazione del potenziale d'azione prevenuta. La conseguenza al blocco della trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici operato dalle PSP tossine, è la paralisi respiratoria cui segue la morte.⁴⁵

La differenza nello stato di carica e nella natura dei sostituenti determina differente affinità di legame per il recettore e differente tossicità tra le varie PSP: in particolare i derivati carbamoilici sono i più tossici e quelli N-sulfo-carbamoilici i meno tossici. Ciò comunque non attenua il rischio di intossicazione in seguito al consumo di molluschi bivalvi contaminati in quanto, una volta ingerite le PSP tossine subiscono processi di trasformazione più o meno complessi; ad es. le tossine del tipo N-sulfocarbamoiliche (che rappresentano il gruppo con tossicità più bassa) vengono facilmente trasformate nelle più potenti carbammato tossine, con un aumento di tossicità fino 40 volte. Questa trasformazione ha un risvolto clinico importante poiché molluschi con bassa tossicità possono causare intossicazioni sproporzionatamente gravi una volta ingeriti. Le tossine PSP vengono trasferite anche a livelli più elevati della catena alimentare, ed in particolare nei pesci ma il problema delle intossicazioni attraverso il consumo di prodotti ittici si pone se questi vengono consumati crudi e con le interiora.⁴³

Il significato biologico delle PSP tossine è stato spesso descritto in termini di auto-difesa anche se la tossicità degli organismi produttori varia da ordine a ordine e a volte anche all'interno della stessa specie, senza nessun apparente effetto sulla loro possibilità di sopravvivenza.

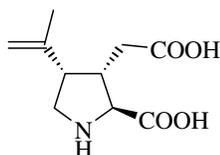
2.2.4 ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*)

L'acido domoico è il principale responsabile dell'avvelenamento da molluschi, definito ASP dall'inglese "Amnesic Shellfish Poisoning".



Acido Domoico

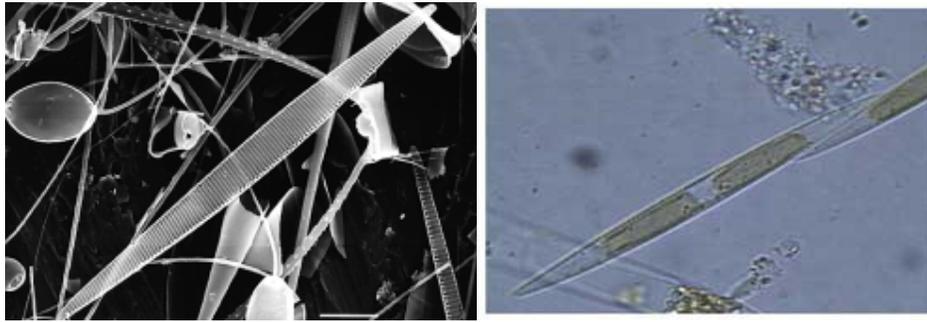
I sintomi dell'avvelenamento da ASP tossine si manifestano sia a livello gastrointestinale che neurologico. I primi includono nausea, vomito, disturbi gastrici e diarrea; i secondi, confusione mentale, debolezza, letargia, perdita permanente della memoria a breve termine e a volte coma. L'acido domoico, un aminoacido ritenuto responsabile di tale sindrome, è stato isolato per la prima volta dalla macroalga rossa *Chondria armata*⁴⁶ nell'ambito di studi sulle proprietà insetticida di estratti algali. Esso appartiene ad un gruppo di amminoacidi con attività eccitatoria sul SNC detti kainoidi, dal nome del capostipite, l'acido kainico, isolato dell'alga rossa *Digenea simplex*,⁴⁷ ed usato in alcune regioni del sud-est asiatico per le sue proprietà antielmintiche.



Acido Kainico

Attualmente, si ritiene che il principale produttore di acido domoico sia la diatomea pennata *Nitzschia pungens* f. *multiseries*,⁴⁸⁻⁵⁰ ma anche altre specie,

quali la *Amphora coffeiformis*⁵¹ e la *Pseudonitzschia australis*⁵² sono ritenute capaci di produrre questa tossina.

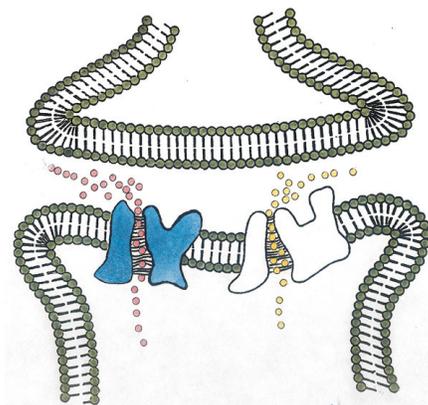


Pseudonitzschia australis

Pseudonitzschia seriata

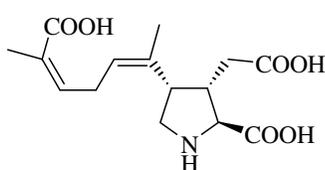
In ogni caso, il contributo di certe diatomee al metabolismo secondario nelle macroalghe è soltanto speculativo, sebbene sia ben noto che la superficie di molte macroalghe è ricoperta proprio di diatomee. E' stato, infatti, dimostrato che una cultura monoalgale dell'alga rossa *Palmaria palmata*⁵³ produce acido kainico a suggerire che la produzione di kainoidi è indipendente dalla specie di macroalghe. L'azione farmacologica dell'acido domoico viene esercitata a livello centrale dove questa tossina si comporta da potente agonista dei recettori del glutammato, che sono in relazione con i canali del Na⁺ della membrana postsinaptica. La parte carbossimetilprolinica dell'acido domoico mima l'acido glutammico e si lega al recettore, mentre la natura della catena laterale inficia l'affinità della molecola per il suo recettore;⁵⁴ la conseguenza di queste azioni a

livello centrale è rappresentata da ingenti danni neuronali.

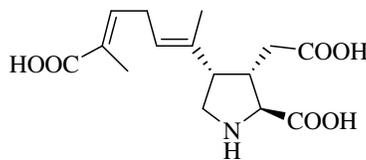


Recettori postsinaptici degli aminoacidi neurotrasmettitori

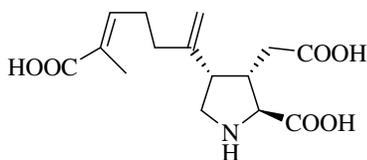
Attualmente sono in corso studi sull'attività biologica degli isomeri dell'acido domoico isolati inizialmente dalla *Chondria armata*.



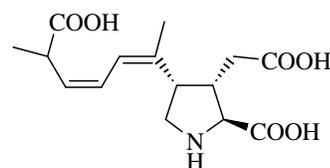
Acido Isodomoico A



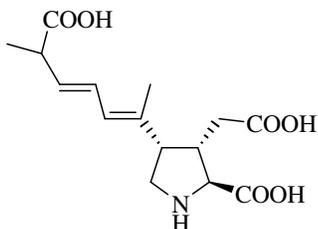
Acido Isodomoico B



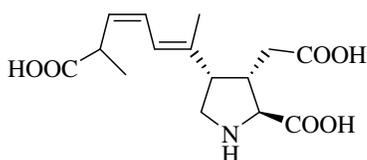
Acido Isodomoico C



Acido Isodomoico D



Acido Isodomoico E



Acido Isodomoico F

Gli acidi isodomoici A-C non sono mai stati riportati da estratti di plankton o di mitili contaminati, mentre gli isomeri geometrici D, E, F sono stati isolati in quantità molto piccole sia da cellule planktoniche sia da molluschi. Tutti gli isomeri, in ogni caso, sembrano avere una minore affinità per i recettori del glutammato suggerendo una tossicità minore rispetto all'acido domoico. E' stato proposto un livello tollerabile di acido domoico di 20 µg/g di parte edibile di mollusco.

2.2.5 NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*)

La sindrome di avvelenamento neurotossico da molluschi indicata con la sigla NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*) si manifesta nell'uomo con disturbi respiratori, irritazione delle membrane oculari e nasali, prurito cutaneo, neuropatia periferica e disfunzioni a carico del sistema nervoso centrale.

La brevitossina B⁵⁵ è il capostipite delle NSP-tossine, una classe piuttosto unica di prodotti naturali, caratterizzati tutti da uno scheletro di anelli polieterei *trans*-fusi. La brevitossina B è stata per la prima volta isolata dal dinoflagellato *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*) che fiorisce periodicamente lungo le coste della Florida e nel golfo del Messico provocando gravi morie di pesci.

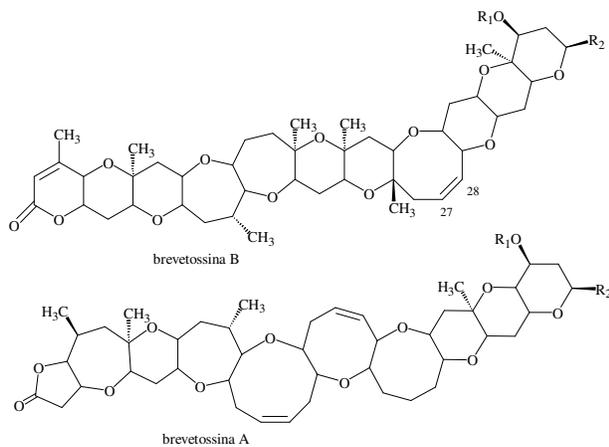


Gymnodinium breve

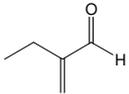
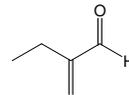
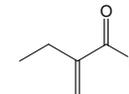
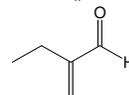
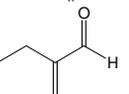
Estese fioriture di questo microrganismo originano, infatti, “maree rosse” che possono uccidere fino a diverse centinaia di tonni al giorno.⁵⁶ In

concomitanza delle fioriture algali si possono anche produrre irritazioni agli occhi e alla gola degli uomini, che vivono nelle zone costiere, dovute alla formazione di aerosol irritanti in cui sono disperse cellule di *G. breve*; così come occasionalmente possono manifestarsi intossicazioni alimentari nei consumatori di molluschi bivalvi contaminati.

Alla classe delle NSP-tossine appartiene anche la brevetossina A, che rappresenta la più potente ittiotossina prodotta dal *G. breve*;⁵⁷ infatti, la sua dose letale sui pesci zebra si aggira intorno alle 3 ppb.⁵⁸ La struttura della brevetossina A, come nel caso della B, è stata delucidata attraverso indagini ai raggi X.⁵⁹ Oltre alla brevetossina A e B sono state isolate e caratterizzate, fino ad oggi, altre brevetossine, tutte a struttura polieterea e caratterizzate da diversi gradi di ossidazione e sostituzione della catena laterale.



| Tossina | Tipo | R ₁ | R ₂ |
|---------|------|----------------|----------------|
| PbTx-1 | A | H | |
| PbTx-2 | B | H | |
| PbTx-1 | A | H | |
| PbTx-2 | B | H | |

| | | | |
|--------|---|---|---|
| PbTx-1 | A | H |  |
| PbTx-2 | B | H |  |
| PbTx-1 | A | H |  |
| PbTx-2 | B | H |  |
| PbTx-1 | A | H |  |

E' riportata la seguente tossicità delle brevetossine espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg¹²⁵ :

- ◆ PbTX backbone B 200
- ◆ PbTX backbone A 100

Il meccanismo d'azione delle brevetossine si esplica per legame ai canali del sodio voltaggio-dipendenti (VSSC).⁶⁰⁻⁶¹ Inizialmente, si è osservato che la brevetossina B attivava un VSSC in cellule di un neuroblastoma in presenza di veratridina; e che tale azione era bloccata dalla tetrodotossina. Saggi di binding che prevedevano l'uso di un radioligando della brevetossina (il PbTx-3, un derivato triziato della brevetossina con una funzione aldeidica in posizione 42), hanno poi dimostrato che la brevetossina B e la tetrodotossina condividevano lo stesso sito di legame a livello del VSSC.⁶²

2.2.6 CIGUATERA-tossine

La ciguatera è una intossicazione tipica delle regioni costiere tropicali e subtropicali, particolarmente dei Caraibi e delle isole del Pacifico. E' provocata dall'ingestione di una grande varietà di pesci che vivono in prossimità delle barriere coralline e che occasionalmente diventano tossici. Il termine

“ciguatera” deriva dal nome usato nel 18° secolo nelle Antille spagnole per una intossicazione alimentare causata dalla “cigua”, un mollusco del genere *Cittarium*.

L'avvelenamento alimentare da ciguatera-tossine, come quello da brevitossine, si manifesta con sintomi neurologici, quali neuropatie periferiche e disfunzioni a livello del SNC, e gastrointestinali, come diarrea, nausea e vomito; a volte subentra anche bradicardia, ipotensione, miosi, cianosi, prostrazione, eritemi e prurito cutaneo. Un sintomo assolutamente caratteristico della ciguatera è la “sensazione da ghiaccio secco”, che si manifesta con senso di calore e bruciore quando la vittima dell'intossicazione immerge le mani in acqua fredda. I sintomi dell'avvelenamento compaiono generalmente entro 12 ore dall'ingestione del pesce contaminato e scompaiono entro qualche settimana, benché talvolta qualche disturbo neurologico può persistere anche per mesi. L'intossicazione è generalmente non letale (la mortalità è inferiore allo 0.5% dei casi) e in alcune zone del Pacifico viene contratta da circa l'1% della popolazione. Attualmente non sono ancora noti antidoti.

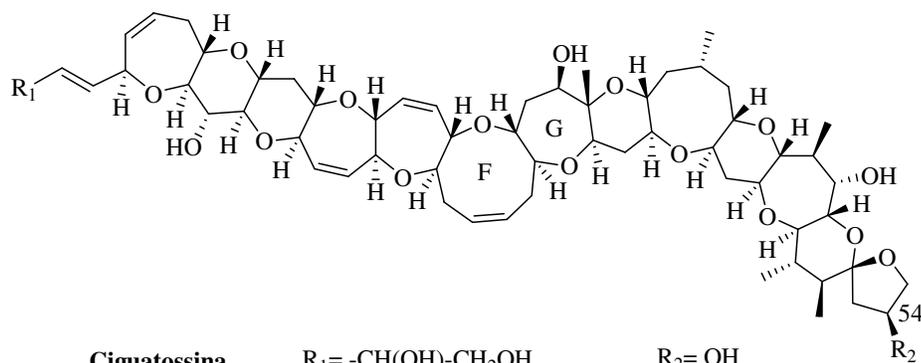
Due gruppi distinti di tossine sono implicati nella ciguatera: la ciguatossina e i suoi congeneri, da una parte, e la maitotossina, dall'altra. Entrambi i gruppi sono prodotti dal dinoflagellato *Gambierdiscus toxicus*, trasferiti a pesci erbivori e successivamente a pesci carnivori attraverso la catena alimentare.



Gambierdiscus toxicus

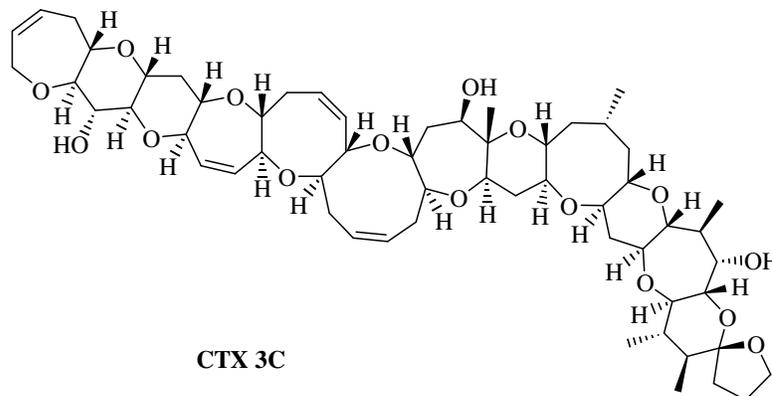
In questo modo i pesci più grandi e più vecchi accumulano una grande quantità di tossina, che si concentra in tutto l'organismo e soprattutto nelle interiora.

Ciguatossina. La ciguatossina è stata per la prima volta isolata nel 1980 da Scheuer presso l'Università delle Hawaii⁶³ e caratterizzata come composto polietereo; tuttavia, le scarse quantità di sostanza disponibili hanno impedito la delucidazione strutturale. Nel 1989, Yasumoto⁶⁴ ha estratto da pesci tossici (*Gymnothorax javanicus*), raccolti nelle acque della Polinesia francese, 0.36 mg di ciguatossina e 0.75 mg di un congenere (CTX 4B, precedentemente definita gambierotossina 4b) e ne ha elucidato la struttura sulla base di esperimenti di risonanza magnetica nucleare.⁶⁵



| | | |
|---------------------|---|---------------------|
| Ciguatossina | R ₁ = -CH(OH)-CH ₂ OH | R ₂ = OH |
| CTX 4B | R ₁ = -CH=CH ₂ | R ₂ =H |

Dal 1989, gli studi sui congeneri della ciguatossina hanno avuto dei rapidi sviluppi e congeneri della ciguatossina sono stati isolati sia da pesci tossici, come la 54-deossi-ciguatossina, che da coltivazioni di *G. toxicus* come la CTX 3C.⁶⁶



Dozzine di analoghi della ciguatossina sono stati isolati da pesci e da dinoflagellati,⁶⁷ ma soltanto per alcuni di essi è stata definita la struttura chimica in maniera conclusiva. In linea generale i composti più polari, e quindi più ossigenati, sono contenuti in quei pesci, quali le anguille, che vivono nelle parti alte dell'ecosistema corallino, mentre nei dinoflagellati sono presenti per lo più i composti meno polari. Infatti, la ciguatossina stessa, che è il composto più ossigenato di questa classe di tossine, è assente nei dinoflagellati. Queste considerazioni suggeriscono che i congeneri meno polari prodotti dal *G. toxicus* sono i precursori delle tossine più polari ritrovate nei pesci, dove hanno luogo trasformazioni di tipo ossidativo. E' interessante notare come la tossicità dei composti ossigenati sia il più delle volte maggiore di quella dei prodotti più apolari, come accade per la ciguatossina, che presenta, per iniezione i.p. nel

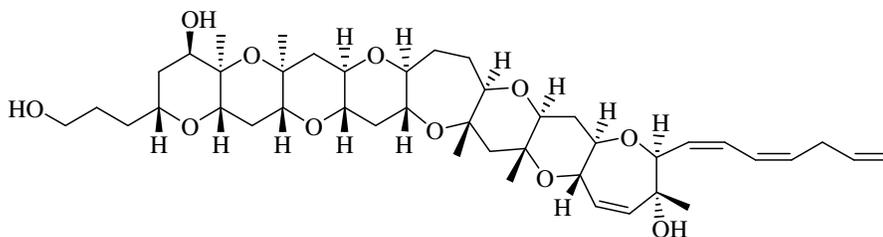
topo una DL50 di 0,45 µg/kg, 11 volte più tossica del suo plausibile precursore, CTX 4B.

Per quanto attiene le azioni farmacologiche e tossicologiche della ciguatossina, sono stati condotti un gran numero di studi in proposito, a causa della centralità della tossina nell'ambito delle malattie umane. Inizialmente, si riteneva che la ciguatossina fosse fundamentalmente un inibitore della colina-esterasi;⁶⁷ in seguito Rayner ha dimostrato che in realtà la tossina favorisce l'ingresso del sodio all'interno della cellula,⁶⁸ perazione al livello dei canali del sodio voltaggio dipendenti (VSSC), così come precedentemente mostrato per le brevitossine.

Si deve notare che esistono sei gruppi di composti polieterei classificati come correlati alla brevitossina: la ciguatossina, la brevitossina-A, la brevitossina-B, l'acido gambierico-A, il gambierolo e la yessotossina. Questi composti, isolati da dinoflagellati o da molluschi che si cibano di dinoflagellati, presentano un'interessante caratteristica comune: tutti possiedono nella porzione centrale della molecola un anello a sette, otto o nove membri, che sembra subire lenti cambi conformazionali. La ciguatossina e gli acidi gambierici sono dotati di un sistema biciclico a sette e a nove termini (anelli F e G della ciguatossina)⁶⁹; mentre la brevitossina B ha un sistema biciclico costituito da due anelli a sette termini. Durante le variazioni conformazionali la molecola può ruotare intorno a una parte della sua stessa struttura, che fungerebbe da perno.

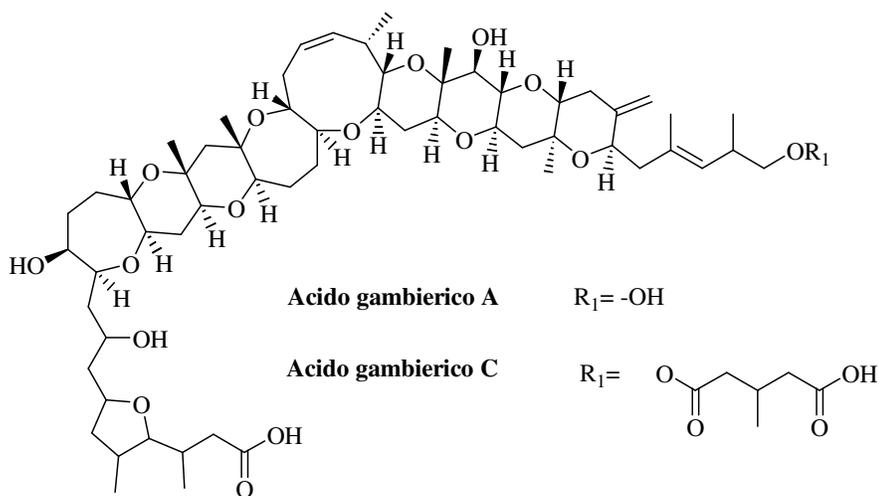
Si ritiene che questi lenti cambi conformazionali possano influenzare in qualche modo il legame al VSSC, inducendo così un'alterazione della funzionalità del canale, o eventualmente disattivandolo del tutto.⁶⁹

Composti correlati alla ciguatera. Il gambierolo è un altro esempio di metabolita del tipo delle brevitossine prodotto dai dinoflagellati.⁷⁰ E' stato isolato come costituente tossico dal *G. toxicus* e mostra un'elevata tossicità su topi, in cui si manifestano i medesimi sintomi descritti per la ciguatossina.



Gambierolo

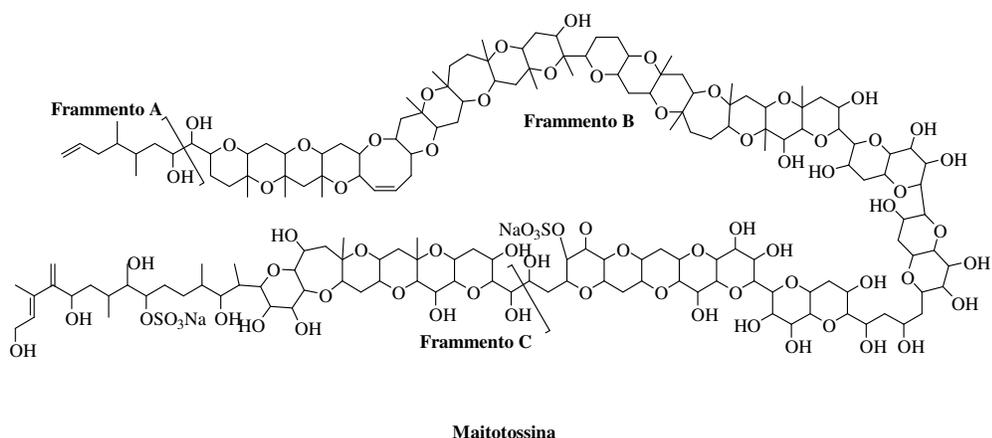
Dal mezzo di cultura del *G. toxicus* sono stati isolati anche altri potenti agenti antifungini, come gli acidi gambierici A-D.⁷¹⁻⁷²



La potenza antifungina dell'acido gambierico-A eccede quella della amfotericina B di un fattore di circa 2000, rendendolo il più potente fungicida conosciuto.

Maitotossina. La maitotossina (MTX) ha attratto l'attenzione dei ricercatori in quanto presenta delle caratteristiche strutturali e farmacologiche piuttosto insolite. In primo luogo, ha un peso molecolare, come sale disodico, di 3422 Da, che supera di gran lunga qualsiasi altro peso molecolare di prodotti naturali,⁷³ ad eccezione dei biopolimeri. In secondo luogo, gioca un ruolo importante nel diversificare i sintomi della ciguatera, in particolare negli avvelenamenti da pesci erbivori. Infine, è dotata di una bioattività estremamente elevata. I risultati di studi di letalità sul topo, per esempio, suggeriscono che essa potrebbe essere la più potente tossina a struttura non proteica mai isolata (LD₅₀ è circa 50 ng/kg, ip).

Recentemente, sulla base di estese analisi NMR, è stata proposta la struttura totale della maitotossina.⁷⁴



La reazione della maitotossina con periodato genera tre prodotti di degradazione (frammenti A, B e C); pertanto le analisi NMR sono state eseguite sia sull'intera molecola che sui rispettivi frammenti. Tra questi ultimi il più grande è il frammento B con un peso molecolare di 2382 Da (come sale sodico); di conseguenza la sua analisi spettroscopica era notevolmente

complicata dalla presenza di ben 160 protoni, e una parte della molecola rimaneva comunque oscura, dal punto di vista strutturale. Ulteriori informazioni sono state ottenute da esperimenti di massa/massa FAB a ioni negativi,⁷⁴ che hanno rivelato in maniera inequivocabile le dimensioni di ciascun anello etero e la sequenza in prossimità degli eteri aciclici, formati in seguito alla degradazione con il periodato.

L'insieme delle informazioni ottenute dall'analisi dei tre frammenti ha permesso la delucidazione dell'intera struttura della maitotossina, che pertanto risulta essere un polietere dalla formula molecolare $C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$, contenente 32 anelli eteri, 28 gruppi ossidrilici e due esteri solfato.

Più di cinquanta lavori sono stati pubblicati sulla farmacologia e la biochimica della maitotossina.

Inizialmente, si riteneva che la sua principale azione fosse quella di aumentare l'afflusso di ioni calcio all'interno delle cellule. Tale azione era bloccata dall'uso del verapamil, per cui si ipotizzava un'azione al livello dei canali del calcio voltaggio-dipendenti.⁷⁵

In seguito, sono state descritte anche altre azioni della maitotossina, come la capacità di indurre contrazioni muscolari, di stimolare il rilascio di ormoni/neurotrasmettitori, di attivare la fosfolipasi C, la fosfolipasi A2 e le proteine-chinasi, alcune delle quali non sembrano essere collegate semplicemente ad un aumento della concentrazione di ioni calcio.⁷⁶

La scarsa specificità della maitotossina per i tessuti e per le linee cellulari fa supporre che la maitotossina ha come sito bersaglio non un recettore fisiologico, ma un componente ubiquitario della membrana cellulare.

Recenti studi elettrofisiologici hanno dimostrato che i canali attivati dalla maitotossina hanno una certa selettività ionica e passa più calcio che sodio, nel rapporto addirittura di circa 50:1.⁷⁷ E' stato anche individuato un inibitore della maitotossina, l'SK&F 96365, che agisce a livello di canali del calcio regolati da recettori; ciò fa supporre che la tossina agisce proprio sui canali mediati dall'azione di recettori.⁷⁸

2.2.7 Tossine prodotte dai cianobatteri

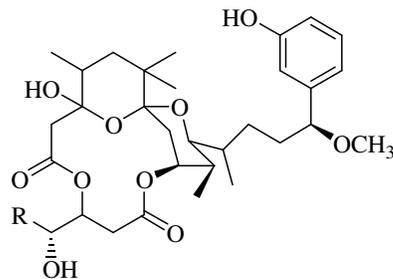
Una vasta gamma di interessanti metaboliti sono stati isolati dalle alghe blu-verdi o cianobatteri, la cui diversità chimica è comparabile soltanto a quella degli Actinomiceti. La maggior parte delle alghe studiate hanno un'origine terrestre o d'acqua dolce, e soltanto di un numero limitato di cianobatteri marini è stato studiato il metabolismo secondario. Nonostante ciò, esistono numerosi indizi secondo i quali i cianobatteri svolgerebbero un ruolo determinante nella produzione di interessanti composti ritrovati frequentemente nell'ambiente marino.

Lyngbya-tossine. Moore et al. hanno dimostrato che l'aplysiatossina ritrovata nella lumaca di mare *Aplysia* nelle acque delle Hawaii è in realtà un derivato metabolico dell'alga blu-verde *Lyngbya majuscola*⁷⁹ ed hanno anche isolato da ceppi di tale alga la debromoaplysiatossina. Sia l'aplysiatossina che il suo debromo-derivato provocano irritazioni cutanee e, per contatto, il cosiddetto "prurito del nuotatore".



Lyngbya spp.

Lo scheletro carbonioso dell'aplisiatossina ricorda quello degli antibiotici macrolidici, ma la sua biogenesi non segue la via dei polichetidi. Per esempio, l'anello aromatico dell'*m*-cresolo non viene ossidrilato con le stesse modalità degli anelli aromatici dei derivati fenilpropanoidi o acetogeninici. L'oscillatossina, composto strettamente correlato ai precedenti e ritrovato nella specie marina *Oscillatoria spp.*, è caratterizzata dal medesimo scheletro carbonioso.⁸⁰



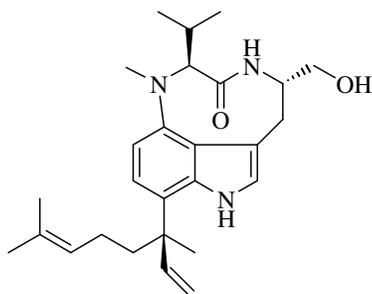
R= CH₃ **Aplisiatossina**

R= **Debromoaplisiatossina**

R= **Oscillatossina**

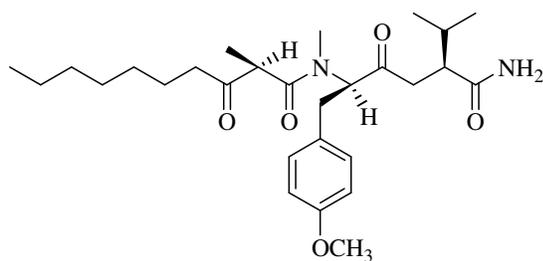
La *Lyngbya* produce inoltre anche altri tipi di composti; ad esempio, le lyngbyatossine, che sono state isolate dalla *L. majuscola* alle Hawaii⁸¹ e sono

simili alle teleocidine, alcaloidi antibiotici prodotti dagli Streptomiceti. Questi composti sono chiaramente biosintetizzati a partire da triptofano, valina e gruppi prenilici.



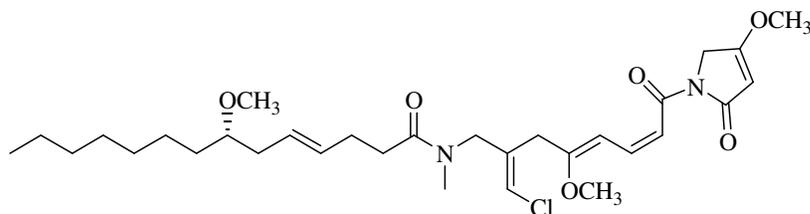
Lyngbyatossina A

L'analisi delle strutture di molti composti marini suggerisce che le alghe blu-verdi contribuiscono alla formazione di tali metaboliti. Infatti, Moore ha individuato dei derivati amidici degli acidi grassi piuttosto insoliti dalla *L. majuscola* che vive nelle acque profonde. Questi composti, rappresentati dalla majusculamide A⁸², sono caratterizzati da una porzione peptidica costituita da valina e tirosina.



Majusculamide A

Le malyngamidi, rappresentate dalla malyngamide A,⁸³ hanno una catena simile a quella dei polichetidi e un 4-metossi- Δ^3 -pirrolin-2-one, struttura, quest'ultima, che potrebbe derivare da una condensazione di Claisen tra un acetato e una glicina.



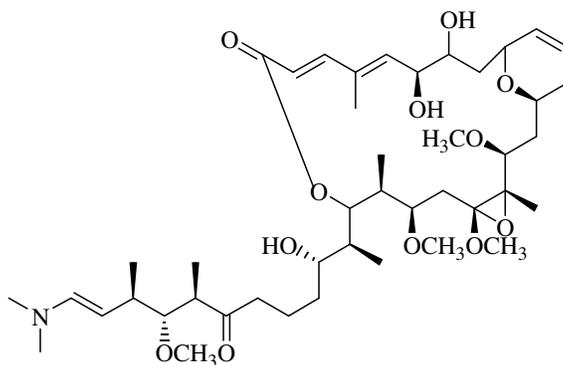
Malyngamide A

Simili sistemi ciclici di tipo pirrolidonico derivati dalla condensazione di aminoacidi e acetati sono presenti in molti altri metaboliti marini. Ad esempio, la disidina isolata dalla spugna *Dysidia herbacea*, è caratterizzata da un anello probabilmente derivante da una valina e un acetato.⁸⁴ E' anche verosimile che tale metabolita derivi da un'alga blu-verde, dal momento che la spugna *Dysidia* vive effettivamente in associazione ad alghe di quel genere. Anche la dolastatina 15, un peptide antitumorale, ritrovato nella lepre di mare, *Dolabella auricularia*, contiene una struttura pirrolidonica costituita da una fenilalanina e un acetato.

Il coinvolgimento degli aminoacidi nella biosintesi di composti di natura polichetidica non è comune negli organismi terrestri, accrescendo ancor più l'unicità del metabolismo delle alghe. E' possibile che alcuni dei polichetidi delle alghe blu-verdi siano sintetizzati in maniera molto diversa dagli organismi terrestri, come succede per i composti polieterei dei dinoflagellati. La diversa composizione chimica dei metaboliti secondari di esemplari della stessa specie

che vivono in diverse aree geografiche, come si verifica per la *Lyngbya*, e la presenza di metaboliti molto diversi tra loro sono caratteristiche analoghe a quelle degli Actinomiceti. Inoltre, la presenza di metaboliti comuni come le lyngbyatossine suggerisce una possibile relazione tra le alghe blu-verdi e gli Actinomiceti.

Tolitossina. Le caratteristiche strutturali di alcuni macrolidi ritrovati negli invertebrati marini suggeriscono una loro possibile derivazione dalle alghe blu-verdi. Per esempio, il bislattone, swiholide A,⁸⁵⁻⁸⁶ e i suoi composti correlati isolati dalla spugna *Theonella* hanno lo stesso scheletro carbonioso della tolitossina o scytoficina rinvenuta nelle alghe blu-verdi terrestri e litorali.



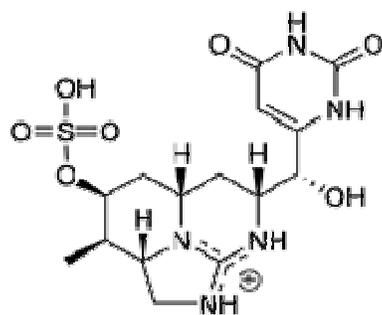
Tolitossina

Peptidi ciclici. Un gran numero di peptidi ciclici sono stati ritrovati nelle alghe blu-verdi d'acqua dolce, ma sono state investigate soltanto poche specie marine. Dalla specie d'acqua salata *Nodularia spumigena*, causa di gravi danni nel mar Baltico e in Nuova Zelanda, è stato isolato il pentapeptide ciclico nodularina⁸⁷. Il composto è strettamente correlato alla microcistina, che è una potente epatotossina e un inibitore delle fosfatasi 2 e 2A, isolata dall'alga blu-verde *Microcystis aeruginosa*.⁸⁸ La struttura sia della microcistina che della

La biosintesi di questi composti sembra riconducibile ad un precursore polichetidico, costituito da fenilalanina, acetato e gruppi metilici provenienti dalla metionina. Una sorprendente scoperta è che il (2*R*, 3*S*)-3-metilaspártato si forma nelle alghe dalla condensazione di un piruvato e di un acetato, seguita da riarrangiamento e da aminazione. Questo è un processo molto diverso da quello solito, che consiste in un riarrangiamento del glutammato ad opera della metilaspártato-mutasi. Questa è un'altra dimostrazione di come le microalghe talvolta adottino strade del tutto differenti e inaspettate per sintetizzare le medesime strutture.

E' opinione piuttosto diffusa che molti dei peptidi ciclici isolati da tunicati e altri invertebrati marini siano in realtà prodotti del metabolismo di alghe blu-verdi simbiotiche o di organismi ad esse strettamente correlati, come i procloroni.⁸⁹ Per esempio, si suppone che il proclorone simbiotico nel tunicato, *Didemnum* spp., sia totalmente o in buona parte responsabile della produzione di didemnine,⁹⁰ rappresentate dalla didemnina A, un potente agente antivirale e antitumorale. Inoltre, molte *Didemnum* spp., che sono simbiotiche con altri procloroni, producono diversi peptidi ciclici. Comunque, finora tutti i tentativi fatti di coltivare i procloroni, per confermare tali ipotesi, si sono dimostrati vani.

Cilindrospermopsina. La cilindrospermopsina (CYN) è un alcaloide epatotossico inizialmente isolato da un ceppo australiano di *Cylindrospermopsis raciborskii*,⁹¹ e poi riportato anche dal cianobatterio giapponese *Umezakia natans*⁹² e in Israele dall'*Aphanizomenon ovalisporum*.⁹³

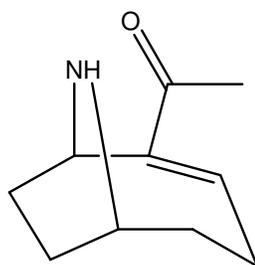


Cilindrospermopsina

I sintomi dell'intossicazione da cilindrospermopsina ricordano quelli dell'epatite virale, con dolori addominali, insufficienza renale e profusa diarrea con presenza di sangue nelle feci. Tuttavia, la tossicologia di questo alcaloide è complessa e ancora deve essere chiarita completamente.

Questa tossina è stata la probabile causa della “misteriosa intossicazione” che si è verificata a Palm Island (Queensland, Australia) nel 1979 e che provocò l'ospedalizzazione di circa 100 persone, tra cui molti bambini.⁹⁴ Da allora, numerosi casi di intossicazioni umane e animali conseguenti all'ingestione di acque contaminate, vengono riportate ogni anno in Australia, ponendo serie preoccupazioni per la salvaguardia della salute pubblica.

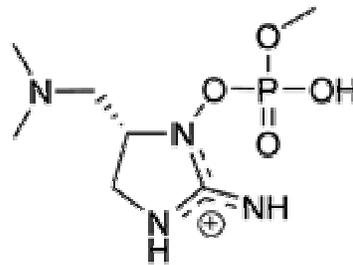
Anatossine. L'anatossina A (ANTX-a) è la prima tossina ottenuta dal cianobatterio d'acqua dolce *Anabaena flos-aquae* ad essere chimicamente definita come l'ammina secondaria, 2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1.]non-2-ene.⁹⁵



Anatossina A

E' un potente agonista nicotino che agisce come agente postsinaptico depolarizzante e bloccante neuromuscolare e mostra un alta tossicità (LD50, i.p. sul topo: 200 µg/kg). L'ANTX-a è stata riportata in Nord-America e nell'Europa settentrionale ma mai in Giappone.⁹⁶

L'anatossina AS è invece un agente anticolinesterasico isolato anche da *Anabaena flos-aquae*.



Anatossina-AS

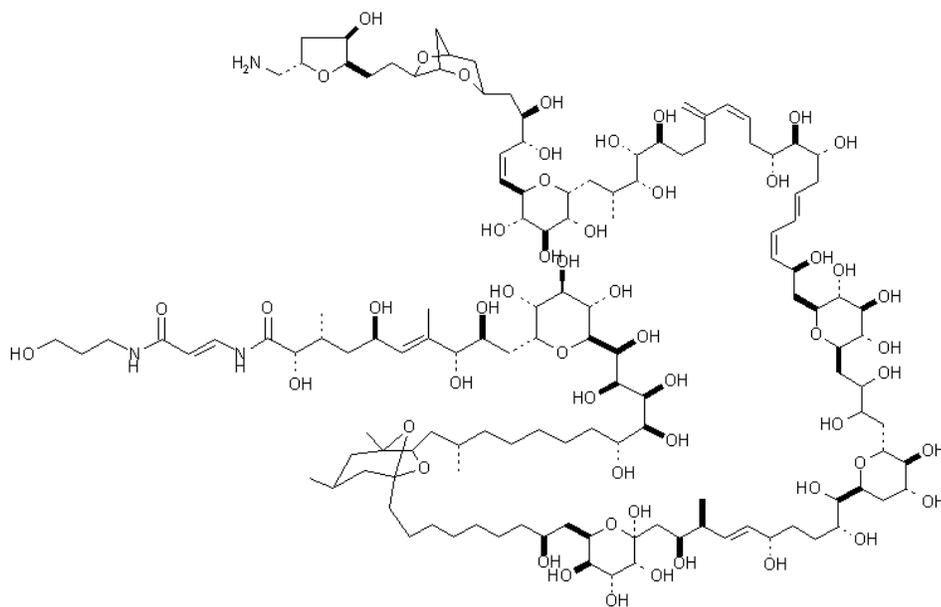


Anabaena flos-aquae

2.2.8 Tossine varie

Palitossina. La palitossina, isolata da alcuni celenterati appartenenti al genere *Palythoa* (Zoantidi) è un potentissimo veleno (la DL50 sul topo è 0.5

$\mu\text{g/Kg}$) ed è il prodotto naturale strutturalmente più complicato finora ritrovato. La determinazione della struttura della palitossina, che è stata isolata per la prima volta dal gruppo di Scheuer ad Honolulu nel 1971,⁹⁷ è stata molto difficile ed ha richiesto il lavoro di circa un ventennio di validissimi gruppi di ricerca dell'Università di Honolulu e Harvard in USA e di Shizuoka e Nagoya in Giappone.⁹⁸ La stereochimica della palitossina è stata determinata per confronto di frammenti sintetici con il prodotto naturale. La palitossina con il suo peso molecolare di 2677 Da ($\text{C}_{129}\text{H}_{223}\text{O}_{54}\text{N}_3$), è stata per lungo tempo, fino alla scoperta della maitossina, considerata la più grande tossina naturale esistente.



Palitossina

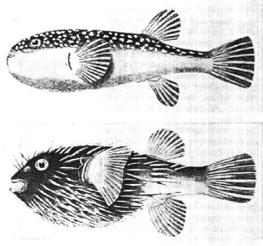
La palitossina e i suoi analoghi non sono stati ritrovati solo nei coralli *Palythoa*, ma anche in una grande varietà di altri organismi come nell'alga *Chondria armata*,⁹⁹ nei granchi appartenenti al genere *Demania* e *Lophozozymus*¹⁰⁴ e nel pesce grilletto *Melichtys vidua*.¹⁰⁰

Il rischio che tale tossina possa trasferirsi dagli zoantidi a pesci comunemente usati nell'alimentazione umana è comunque molto basso; soltanto occasionalmente, infatti, è stata segnalata la sua presenza in pesci e molluschi eduli raccolti nel Pacifico, lungo la costa del Giappone, delle Filippine e di Singapore.

Sono state effettuate numerose ricerche farmacologiche e biochimiche sulla palitossina,¹⁰¹ come quelle relative alla attività depolarizzante di membrana, di modifica dei flussi intracellulari di ioni sodio e calcio, di stimolazione del rilascio di acido arachidonico e di neurotrasmettitori, di inibizione dell'enzima Na^+/K^+ -ATPasi, di induzione della contrazione della muscolatura liscia, all'attività *tumor-promoting*, etc.

Se da un lato è stato proposto che la palitossina agisce attraverso l'enzima Na^+/K^+ -ATPasi,¹⁰¹ il meccanismo dettagliato dell'azione è ancora poco chiaro, così come non è ancora del tutto noto il meccanismo d'azione alla base degli svariati effetti biologici sull'organismo.

Tetrodotossina. La tetrodotossina è una delle più potenti neurotossine non proteiche attualmente note, responsabile di numerosi casi di mortalità umana. Il nome deriva dai pesci della famiglia dei Tetraodontidae ed è largamente diffusa nel regno animale sia marino che terrestre.¹⁰²⁻¹⁰⁴ L'avvelenamento da TTX è conosciuto da oltre 2000 anni; infatti, in Giappone da tempi remoti si ricordano casi in cui l'ingestione di pesce palla (*Tetraodon*), in cui la tossina si accumula principalmente nel fegato, nelle ovaie e nelle viscere, è seguita da paralisi.¹⁰⁵ Si ritiene anche che lo stato "zombie" descritto nei riti Voodoo sia da attribuirsi alla tetrodotossina presente in certe pozioni, preparate utilizzando estratti di pesce palla.¹⁰⁶



pesce palla (*Tetraodon*)

Ancora oggi, in varie nazioni asiatiche e specialmente in Giappone, dove il pesce palla è considerato un cibo prelibato, esiste ed è relativamente frequente questo tipo di intossicazione, che si manifesta con intontimento, bradicardia, convulsioni, paralisi e in alcuni casi morte per arresto cardiaco. La DL50 sul topo per iniezione i.p. è di 10 µg/kg.

Numerose misure preventive vengono adottate per evitare le intossicazioni, ad esempio, solo personale esperto e munito di licenza può maneggiare il pesce palla nei mercati e rimuoverne le viscere.

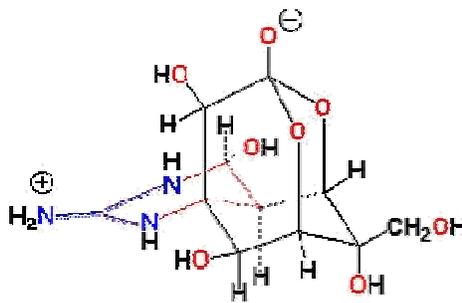
Oltre che nel pesce palla la tetrodotossina è stata anche ritrovata in un pesce molto differente dal punto di vista tassonomico, il *Gobrius criniger*,¹⁰⁷ nella salamandra californiana *Taricha torosa*¹⁰⁸ e nel polipo *Hapalochlaena maculosa*.¹⁰⁹

E' stato suggerito che la TTX giochi un ruolo anti-predatorio negli animali che la accumulano; infatti, il pesce palla emette piccolissime quantità di tetrodotossina attraverso al pelle quando viene toccato, allo scopo evidente di scoraggiare la predazione.¹¹⁰

Le variazioni di concentrazione della tetrodotossina a seconda delle specie animali, delle stagioni e delle zone geografiche suggeriscono chiaramente la sua origine esogena rispetto agli animali contaminati. La principale fonte di TTX è un batterio,¹¹¹ che dapprima veniva identificato nello

Pseudomonas sp., poi nell'*Alteromonas* sp. e infine in una nuova specie, la *Shewanella alga*.¹¹²

La struttura molecolare della TTX, caratterizzata da un gruppo guanidinico e da una singolare funzione emilattolica, è stata determinata nel 1964 quasi simultaneamente in due laboratori giapponesi diretti dai professori Tsuda e Hirata e due statunitensi diretti dai professori Woodward e Mosher.

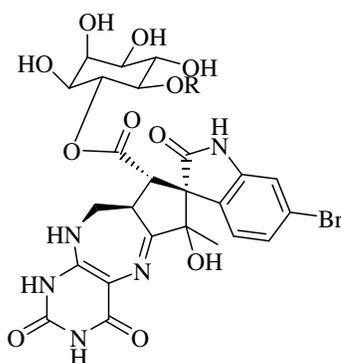


TTX

La tossina è stata isolata in forma pura e identificata in modo inequivocabile attraverso tecniche di massa, come il FAB, attraverso HPLC fluorimetrico, saggi di tossicità sul topo e degradazione a 2-amino-6-(idrossimetil)-8-idrossichinazolina. Successivamente una vasta gamma di batteri sono stati individuati come produttori di TTX,¹¹³⁻¹¹⁵ benché le quantità di tossina fossero talmente basse, che la sua identificazione è stata condotta sulla scorta di evidenze, a dire il vero, piuttosto povere. Inoltre la scarsa abbondanza di TTX nei batteri non ha nemmeno permesso ai chimici di effettuare degli studi biosintetici.

Neosurugatossina e prosurugatossina. La conchiglia d'avorio *Babylonia japonica*, che è largamente consumata in Giappone, ha causato numerose intossicazioni, i cui sintomi sono perdita della visione, marcata

dilatazione della pupilla, sete, intorpidimento delle labbra, difficoltà nella pronuncia, costipazione e disuria. Le tossine responsabili, denominate neosurugatossina e prosurugatossina, sono state isolate dalle ghiandole digestive del mollusco e la loro struttura è stata definita anche attraverso studi sintetici.



Neosurugatossina R= β-xilosio

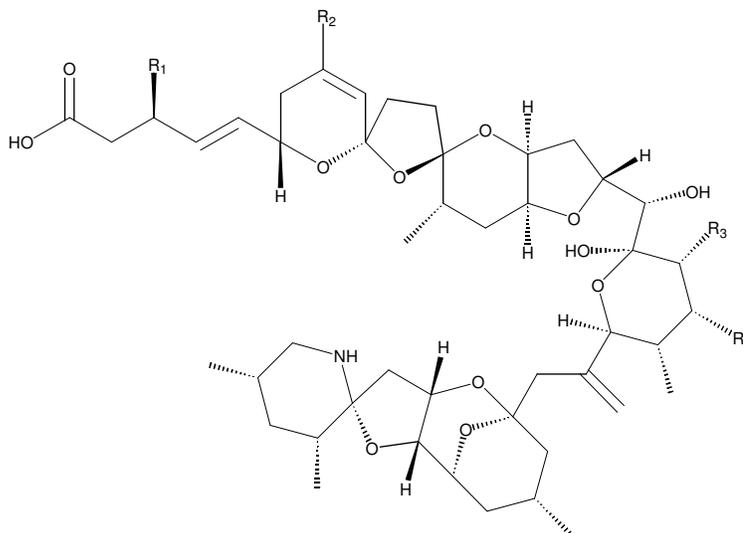
Prosurugatossina R= H

Per entrambe le tossine è stata suggerita un'origine esogena, dal momento che gli organismi produttori potrebbero essere dei batteri appartenenti al gruppo dei *Coryneformi*.¹¹⁶

La neosurugatossina e la prosurugatossina sono circa 5000 volte più attive come bloccanti gangliari di qualsiasi altro farmaco attualmente conosciuto, come la mecamilamina o l'esametonio. Il loro meccanismo d'azione prevede un blocco specifico dei recettori nicotinici gangliari; e pertanto rappresentano degli ottimi strumenti negli studi sulla neurotrasmissione e sul cervello.

Azaspiracidi. Gli azaspiracidi sono biotossine di recente scoperta riportate da McMahon e Silke come le responsabili dell'avvelenamento diarroico verificatosi in Olanda nel 1995.¹¹⁷

La struttura del capostipite di questa classe di tossine è stata determinata in Giappone e la tossina fu chiamata azaspiracido con riferimento alla presenza di un anello azaspiro e di una funzione acida nella molecola.¹¹⁸ Da quel momento l'intossicazione da azaspiracidi è stata denominata AZP.¹¹⁹ Dal 1996 parecchi incidenti da AZP si sono verificati in Irlanda ed in altri paesi europei, prevalentemente dovuti all'ingestione di mitili prodotti in Irlanda. Oltre all'AZA sono stati isolati ed identificati altri quattro analoghi (AZA 2-5).



| <u>Tossina</u> | <u>R₁</u> | <u>R₂</u> | <u>R₃</u> | <u>R₄</u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| AZA | H | H | Me | H |
| AZA2 | H | Me | Me | H |
| AZA3 | H | H | H | H |
| AZA4 | OH | H | H | H |
| <u>AZA5</u> | H | H | H | <u>OH</u> |

Sebbene la comprensione delle trasformazioni metaboliche di queste tossine nei mitili sia di primaria importanza nell'ambito di studi di depurazione, non esistono a tutt'oggi dati sperimentali su se e come gli azaspiracidi vengano modificati nei molluschi. Per analogia con le pectenotossine e le yessotossine

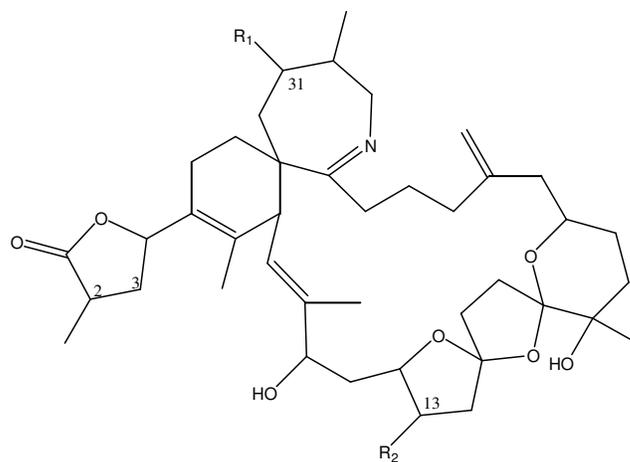
che subiscono reazioni di idrossilazione nei mitili, si può presumere che gli AZA 4 e 5 siano prodotti di ossidazione dell'AZA 3. Dal momento che, poi, non sono note modifiche biochimiche delle tossine per metilazione o demetilazione, è verosimile che gli AZA, AZA 2 e AZA 3 siano prodotti originali dei dinoflagellati.

La dose letale 50 degli azaspiracidi sul topo per i.p. è espressa in mg/kg¹²⁰:

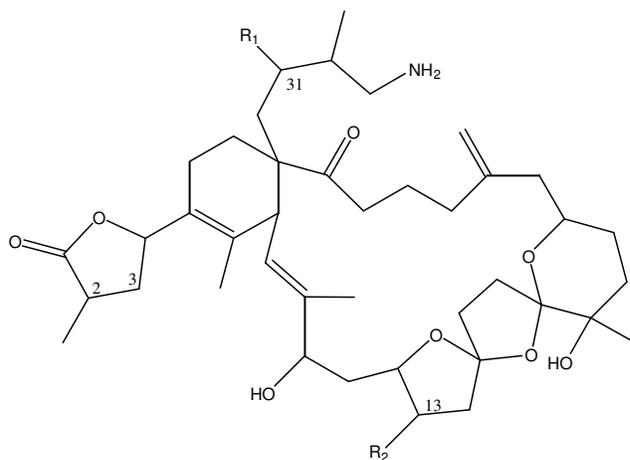
| | |
|--------|------|
| ➤ AZA | 0,20 |
| ➤ AZA2 | 0,11 |
| ➤ AZA3 | 0,14 |
| ➤ AZA4 | 0,47 |
| ➤ AZA5 | 1,00 |

Studi istopatologici hanno dimostrato che tali tossine provocano danni al fegato, al pancreas, al timo e a tutto l'apparato digerente.¹²¹ E' stato inoltre notato che tali tossine sono citotossiche su cellule P388 ma non su cellule KB, e che non inibiscono la protein fosfatasi 2A.

Spirolidi. Gli spiroolidi sono immine macrocicliche isolate e caratterizzate, molto recentemente, dagli estratti lipofili di mitili raccolti in Nova Scotia, Canada.¹²²

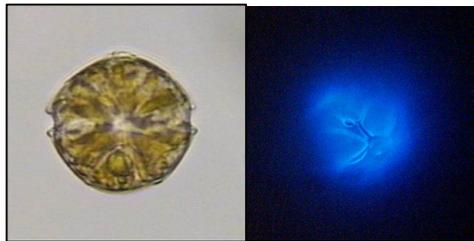


| | <u>R₁</u> | <u>R₂</u> | <u>Δ</u> |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Spirolide A | H | Me | Δ ^{2,3} |
| Spirolide B | H | Me | |
| Spirolide C | Me | Me | Δ ^{2,3} |
| Spirolide 13-desMe-C | Me | H | Δ ^{2,3} |
| Spirolide D | Me | Me | |
| Spirolide 13-desMe-D | Me | H | |



| | <u>R₁</u> | <u>R₂</u> | <u>Δ</u> |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Spirolide E | H | Me | Δ ^{2,3} |
| Spirolide F | H | Me | |

Sono tossine a rapida azione che causano nel topo, dopo iniezione intra-peritoneale sintomi che includono spasmi addominali, piloerezione, iperestensione della schiena, inarcamento della coda, convulsioni e morte entro 3-20 minuti dall'iniezione. Sintomi neurologici compaiono nel topo anche dopo somministrazione orale, ma il meccanismo d'azione rimane ancora sconosciuto. L'origine planctonica di tali tossine, suggerita dalle analogie strutturali con altri macrolidi prodotti da dinoflagellati quali la gimnodimina (*Gymnodinium mikimotoi*) e i prorocontrolidi (*Prorocentrum lima*), è stata confermata quando spiroolidi sono stati isolati da una coltura monoalgale del dinoflagellato marino *Alexandrium ostenfeldii*.¹²³



Alexandrium ostenfeldii.

Venerupina (VSP) L'intossicazione da venerupina è una sindrome non paralitica causata dall'ingestione di vongole (*Venerupis semidecussate*) e ostriche (*Crasso-strea gigas*) che hanno accumulato dinoflagellati tossici. La specie che si ritiene responsabile di questa intossicazione è il *Prorocentrum minimum*¹²⁴, che produce "acque colorate" soprattutto in Giappone, nel Mar Baltico e in Portogallo.



Prorocentrum minimum

La natura della tossina responsabile dell'intossicazione da venerupina non è stata ancora definita. L'avvelenamento è caratterizzato da una lunga incubazione di 24-48 ore a cui fa seguito un inizio repentino dei sintomi che sono nausea, vomito, diarrea, cefalea e agitazione. Nei casi più gravi possono manifestarsi delirio, disfunzione epatica fino a coma epatico e la morte sopraggiunge in circa il 33% dei pazienti.

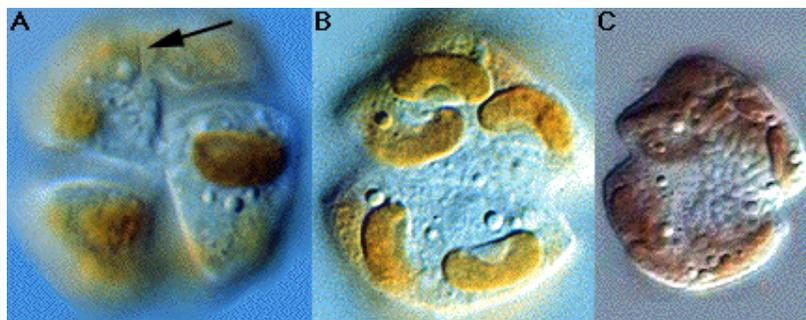
Cooliatossina. La Cooliatossina è stata isolata nel 1995 dal dinoflagellato *Coolia monotis* presente in Australia. Seppure *C. monotis* è stata ritrovata nelle zone colpite da ciguatera (Besada et al. 1982), la cooliatossina tende a non bioaccumularsi nei pesci, e iniettata al topo per via intraperitoneale non produce la sintomatologia caratteristica dell'avvelenamento da ciguatera pur presentando una DL 50 di 1 mg/Kg¹²⁶



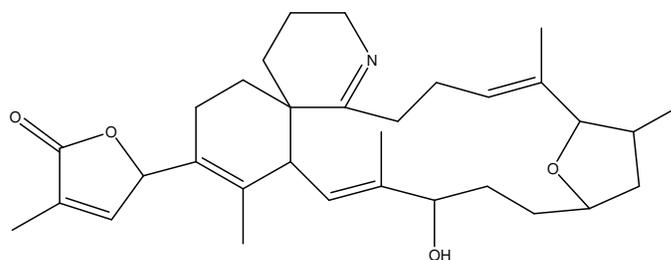
Coolia monotis

Il peso molecolare della Cooliatossina corrisponde a 1062 da in analogia alla forma monosolfatata della yessotossina. Inoltre i sintomi clinici che questa tossina induce nel topo risultano analoghi a quelli prodotti dalla yessotossina, ovvero dopo un primo periodo in cui non vi sono sintomi evidenti di intossicazione insorgono ipotermia e difficoltà respiratorie. L'attività della cooliatossina *in vitro* mostra un iniziale stimolazione e successivo blocco dei nervi non mielinizzati. La funzione solfato sembra essere fondamentale all'attività tossica infatti una desolfatazione reduce l'azione tossica di tutte le tossine polieteree solfatate quali yessotossina e maitotossina.

Gimnodimina. La Gimnodimina è una neurotossina che, per la prima volta, fu isolata dalle ostriche, in concomitanza alla proliferazione del dinoflagellato *Gymnodinium cf. mikimotoi*.



Gymnodinium cf. mikimotoi



Gimnodimina

Le caratteristiche chimico-strutturali della (-)-gimnodimina includono un anello tetraidrofuranico trisostituito incorporato in un anello carbociclico a 16 termini, un butenolide chirale ed una funzione amminica spirociclica. La funzione amminica risulta implicata nell'attività biologica.

2.2.9 Conclusioni

Le microalghe marine, con il loro metabolismo spesso unico da un punto di vista chimico e strutturale, sembrano essere una fonte davvero promettente di composti farmacologicamente attivi, senza contare che alcune decine di

migliaia di specie non sono state ancora investigate e che moltissimi composti presenti nell'ambiente marino hanno la propria origine direttamente nelle microalghe stesse.

Purtroppo, la chimica delle microalghe marine è ancora agli albori a causa delle grosse difficoltà nel coltivare le diverse specie in laboratorio e per il fatto che spesso non è possibile realizzare lavori chimici su campioni di popolazioni microalgali raccolti in mare aperto. Attualmente, molti organismi come i dinoflagellati, i cianobatteri e i procloroni delle ascidie restano per molti versi oscuri, nonostante siano molto studiati. A rendere la questione ancora più complessa, c'è il fatto che, una volta ottenuti i microrganismi in coltura, non sempre essi producono le sostanze desiderate.

Pertanto, il progresso della chimica delle microalghe è strettamente connesso con quello delle tecniche di coltivazione, con quello delle tecniche di rivelazione chimica dei loro metaboliti e quindi con la comprensione del loro metabolismo.

Un altro elemento a supporto dell'utilità della ricerca sulle microalghe e sul loro metabolismo è la sempre più frequente incidenza di episodi di intossicazione umana dovuti a ingestione di molluschi contaminati da metaboliti microalgali e di morie di pesci, con preoccupanti conseguenze sulla salute pubblica e sull'industria del pesce e dei molluschi. Una maggiore consapevolezza pubblica e i migliorati sistemi di indagine potrebbero spiegare l'aumento degli incidenti legati alla tossicità delle microalghe, riportati con allarmante frequenza in tutto il mondo. Comunque, bisognerebbe porre maggiore attenzione al deterioramento dell'ambiente marino e alla diffusione di cisti resistenti di specie nocive, legate alle chiglie delle navi. Di conseguenza, in

futuro ci saranno ulteriori problemi da risolvere attraverso procedimenti e interventi di natura chimica.

Come accennato in precedenza, a dispetto di tutti gli ostacoli presenti in questo ambito di ricerca, notevoli progressi sono stati effettuati nella delucidazione strutturale delle tossine, specialmente di tipo polietereo; e così pure nell'identificazione delle fonti di sostanze tossiche, come si è visto nel caso della tetrodotossina e della ciguatossina.

Non bisogna poi trascurare il contributo che le tossine hanno fornito alle scienze della vita, come la biologia o la farmacologia. Una tossina, infatti, possedendo nella propria struttura uno o più gruppi funzionali responsabili dell'attività biologica, può trovare agevolmente applicazione nel campo farmaceutico o come farmaco o come reagente farmacologico o ancora più spesso come modello per la sintesi o il miglioramento di altri medicinali.

Recentemente, si è cercato di sviluppare molto l'indagine degli organismi marini, al fine di individuare nuovi farmaci antitumorali, antibiotici, emolitici, analgesici, antispasmodici, ipotensivi o ipertensivi. E tale attività ha condotto ad almeno due importanti risultati: il primo è rappresentato dalla tetrodotossina, che è stata utilizzata come reagente farmacologico; il secondo è un nuovo insetticida derivato dalla nereistossina. La tetrodotossina a causa della sua elevata tossicità non è mai stata usata come farmaco, nonostante i continui sforzi e tentativi da parte dei ricercatori; ma verso la fine degli anni '60 è stato scoperto che la tetrodotossina inibisce selettivamente la permeabilità al sodio delle membrane nervose, con conseguente paralisi dei nervi periferici. Tuttavia, poiché la paralisi è di tipo reversibile, la tetrodotossina si è rivelata un efficace strumento per la delucidazione del meccanismo dell'eccitazione nervosa.

Per quanto riguarda la nereistossina, era già noto tra i pescatori, ben prima della scoperta della tossina, che le mosche morivano quando venivano a contatto con il *Lumbrineris brevicirra*, comunemente usato come esca. L'agente moschicida è stato isolato nel 1934, ma la sua struttura chimica è rimasta a lungo sconosciuta. Oggi la nereistossina funge da modello per la sintesi di alcuni tra i più efficaci insetticidi.

Al momento sembra, comunque, essere più promettente l'impiego delle tossine come reagenti farmacologici; infatti, dopo la tetrodotossina, anche la saxitossina, la palitossina e la surugatotossina sono in fase di studio per un loro eventuale impiego nella sperimentazione farmacologica.

Alla luce di tutte queste considerazioni appare chiaro che solo gli sforzi concertati di chimici, biochimici, farmacologi e biologi potranno aprire una nuova era nello studio delle tossine marine.

2.2.10 Riferimenti bibliografici

1. Vogt, W. *Toxicon*, **1970**, 8, p. 251.
2. Jeffrey, L.C., Wright A, D. Cembella, *Physiological ecology of harmful algal blooms*, Anderson D., Cembella A., Hallergraeff G. (eds), **1998**, p. 427.
3. Viviani R. *The veterinarian in the control of aquatic biotoxins*. Bologna: Grasso, **1981**, p. 1.
4. Hashimoto, Y.; Kamiya, H. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **1970**, 36, p. 425.

5. Auerbach P.S, in: Tu AT (Ed.). *Handbook of natural toxins-marine toxins and venoms*. New York and Basel: M Dekker Inc.; 1988. p. 493-565.
6. Suganuma, M.; Fujiki, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayatsu, M.; Ojika, M.; Waknamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T.; *Pr. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, p. 1768.
7. Kat, M. In Anderson D. M., White A. W. Baden D. G. (eds), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, Amsterdam, p. 73-77.
8. Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, N.; Fujita; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1980**, *46*, p. 1405.
9. Yasumoto, Y.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J.; *Seafood Poisoning*, **1984**, p. 208.
10. Tachibana, K.; Scheuer, P.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 2469.
11. Murakami, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1982**, *48*, p. 69.
12. Dickey, R. W.; Borzin, S. C.; Faulkner, D. J.; Bencsath; F. A.; Andrzejewski, D.; *Toxicon*, **1990**, *28*, p. 371.
13. Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, T.; Fujita, N.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1980**, *46*, p. 1405.
14. Murata, M.; Shimatani, M.; Sugitani, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1982**, *48*, p. 549.
15. Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Engen, D. V.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schimtz, J. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 2496.

16. Murata, M.; Shimatani, M.; Sugitani, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.;
Nippon Suisan Gakkaishi, **1982**, 48, p. 549.
17. Working Group on Toxicology of DSP and AZP. *Report of the meeting of the Working Group on Toxicology of DSP and AZP*, Brussels, 21-23rd May **2001**, p.21
18. Shibata, S.; Ishidaq, Y.; Kitano, H.; Ohizumi, Y.; Habon, J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1982**, 223, p. 135.
19. Sukanuna, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayatsu, M.; Ojikaq, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, 85, p. 1768.
20. Berenblum, I.; *Cancer Res.*, **1941**, 1, p. 44.
21. Boutwell, R. K.; *Carcinogenesis: Mechanisms of Tumor Promotion and Carcinogenesis*, **1978**, 2, p. 49.
22. Hecker, E.; *Methods Res.*, **1971**, 6, p. 439.
23. Sukanuma, M.; Fujiki H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayasu, M.; Ojika, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Sugimura, T.; *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **1988**, 79, p. 1089.
24. Sukanuma, M.; Tatematsu, M.; Yatsunami, J.; Yoshizawa, S.; Okabe, S.; Uemura, D.; Fujiki, H.; *Carcinogenesis*, **1992**, 3, p. 321.
25. Nishiwaki, S.; Fujiki, H.; Sukanuma, M.; Furuya-Suguri, J.; Matsushima, R.; Iida, Y.; Ojika, M.; Yamada, K.; Uemura, D.; Yasumoto, T.; Schmitz, F. J.; Sugimura, T.; *Carcinogenesis*, **1990**, 11, p. 1837.
26. Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J.; *Tetrahedron*, **1985**, 41, p. 1019.

27. Murata, M.; Sano, M.; Iwashita, T.; Naoki, H.; Yasumoto, T.; *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, p. 2693.
28. Terao, K.; Ito, E.; Oarada, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *Toxicon*, **1990**, *28*, p. 1095.
29. Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, p. 5869.
30. Naoki, H.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, *7*, p. 179.
31. Satake, M.; MacKenzie, L. Yasumoto, T. *Natural Toxins*, **1997**, *5*, p. 164.
32. Satake, M.; Terasawa, K.; Kadowaki, Y.; *Tetrahedron lett.* **1996**, *37*, p. 5955.
33. Tubaro, A; Della loggia, R; Yasumoto, T; in Reguera, B; Blanco, J; Fernandez, M.L.; yatt, T; (ed.) *Proceedings of the VIII WInternational Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June **1997**. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; **1998**. p.470.
34. Satake, M.; Terasawa, Y.; Kadowaki, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, p. 5955.
35. (a) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Satake, M.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Toxicon* **1997**, *35*, p. 177. (b) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Toxicon* **1999**, *37*, p. 689. (c) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, p. 8897. (d) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2*, p. 291. (e) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, p. 770.

36. Ogino, H.; Kumagai, M.; Yasumoto, T.; *Natural Toxins*, **1998**, *1*, p. 20.
37. Leira, F.; Alvarez, C.; Vieites, J.M.; Vieites, M.R.; Botana, L.M.; *Toxicology in Vitro* **2002**, *16*, p.23.
38. Malaguti, C.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Rossini, G.P.; *Toxicology in Vitro* **2002**, *16*, p. 357.
39. Gemmill, J. S.; Manderson, W. G.; *Lancet*, **1960**, *2*, p. 307.
40. Schantz, E.J.; Mold, J.D.; Stanger, D.W.; Shavel, J; Riel, F.J.; Bowden, J.P.; Lynch, J.M.; Wyler, R.S.; Riegel, B,R.; Sommer, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *72*, p. 5230.
41. (a) Shantz, E. J.; Ghazarossian, V. E.; Schonoes, H. K.; Strong, F. M.; Springer J. P.; Pezzante, J. O.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, p. 1238. (b) Shimizu, Y.; Fallon, W. E.; Oshima, Y.; Miura, I.; Nakanishi, K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, p. 6791. (c) Shimizu, Y.; Fallon, W. E.; Wekell, J. C.; Gerber, D. G.; Gauglitz, E. J.; *J. Agric. Food. Chem.*, **1978**, *26*, p. 878.
42. World Health Organization. *Aquatic (marine and freshwater)biotoxin*. Geneva: WHO; **1984**, (Environmental Health Criteria 37), p. 1.
43. Viviani, R.; in: Vollenweider R.A.; Marchetti, R.; Viviani, R.; (ed.) Marine coastal eutrophication. *Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990*, *Sci Total Environ*; **1992**, (suppl.) p. 631.
44. Schantz, E.J.; Mold, J.D.; Howard, W.L.; Bowden, J.P.; Stanger, D.W.; Lynch, J.M.; Wintersteiner, O.P.; Dutcher, J.D.; Walters, D.R.; Riegel, B,R.; *Can. J. Chem.*, **1961**, *39*, p.2117.
45. Kao, C.Y., *Fed Proc*, **1972**, *31*, p. 1117.
46. Daigo, K.; *Yakugaku Zasshi*, **1959**, *79*, p. 350, 353, 356

47. Murakami, S.; Takemoto, T.; Shimizu, S.; *Yakugaku Zasshi*, **1953**, 73, p. 1026.
48. Atlantic Research Laboratory Technical Report 56, NRCC 29083; 57, NRCC 29086.
49. Subba Rao, D. V.; Quilliam, M. A.; Pocklington, R.; *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **1988**, 45, p. 2076.
50. Maranda, L.; Wang, R.; Masuda, K.; Shimizu, Y.; *Toxic marine phytoplankton*, **1989**, p. 300.
51. Shimizu, Y.; Gupta, S.; Masuda, K.; Maranda, L.; Walker, C. R.; Wang, R.; *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, p. 513.
52. Fritz, L.; Quilliam, M. A.; Wright, J. L. C.; Beale, A. M.; Work, T. M.; *J. Phycol.*, **1992**, 28, p. 439.
53. Laycock, M. V.; Bird, C. J.; *Abstract of papers*, Vancouver, Canada, **1989**, p. 87.
54. Zaman, L.; Arakawa, O.; Shimosu, A.; Onoue, Y.; Nishio, S.; Shida, Y.; Noguchi, T.; *Toxicon*, **1997**, 35, p. 205.
55. Ramsey, U.; Douglas, D.; Douglas, S.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C.; *Abstract of papers*, Baltimore, **1991**, p. 70.
56. Steidinger, K. A.; Baden, D. G.; *Dinoflagellates*, **1984**, p. 201.
57. Shimizu, Y.; Gupta, S.; Norte, A.; Hori, A.; Genenah, A.; Kobayashi, M.; *Proc. Int. Conf. On Toxic Dinoflagellates*, **1985**, 3, p. 271.
58. Nakanishi, K.; *Toxicon*, **1985**, 23, p. 473.
59. Shimizu, Y.; Chou, H. N.; Bando, J.; Van Duyne, T.; Clardy, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, p. 514.
60. Catterall, W. A.; Risk, M.; *Mol. Pharmacol.*, **1981**, 19, p. 345.

61. Bidard, J. N.; Vijverberg, H. P. M.; Frelin, C.; Chunge, E.; Legrand, A. M.; Bagnis, R.; Lazdunski, M.; *J. Biol. Chem.*, **1986**, *479*, p. 204.
62. Lombet, A.; Bidard, J. N.; Lazdunski, M.; *FEBS Lett.*, **1987**, *219*, p. 355.
63. Nukina, M.; Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; *Natural toxins*, **1986**, p. 46.
64. Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, p. 8927.
65. Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, p. 4380.
66. Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, Y.; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, p. 1975.
67. Li, K. M.; *Science*, **1965**, *147*, p. 1580.
68. Rayner, M. D.; Kosaki, T. I.; Fellmeth, E. L.; *Science*, **1968**, *160*, p. 70.
69. Murata, M.; Legrand, A. M.; Scheuer, P. J.; Yasumoto, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, p. 525.
70. Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, p. 361.
71. Nagai, H.; Torigoe, K.; Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Hirota, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, p. 1102.
72. Nagai, H.; Murata, M.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T.; *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, p. 5448.
73. Yokoyama, A.; Murata, A.; Oshima, Y.; Iwashita, T.; Yasumoto, T.; *J. Biochem.*, **1988**, *104*, p. 184.
74. Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, p. 6594.

75. Takahashi, M.; Ohizumi, Y.; Yasumoto, T.; *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, p. 7287.
76. Gusovsky, F.; Daly, J. W.; *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *39*, p. 1633.
77. Kobayashi, M.; Ochi, R.; Ohizumi, Y.; *Br. J. Pharmacol.*, **1987**, *92*, p. 665.
78. Soergel, D. G.; Yasumoto, T.; Daly, J. W.; Gusovsky, F.; *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *41*, p. 487.
79. Mynderse, J. S.; Moore, R. E.; Kashiwagi, M.; Norton, T. R.; *Science*, **1977**, *196*, p. 538.
80. Mynderse, J. S.; Moore, R. E.; *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, p. 2301.
81. Cardellina, J. H.; Marner, F. J.; Moore, R. E.; *Science*, **1979**, *204*, p. 193.
82. Marner, F. J.; Moore, R. E.; Hirotsu, K.; Clardy, J.; *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, p. 2815.
83. Cardellina, J. H.; Marner, F. J.; Moore, R. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, p. 240.
84. Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Cerny, R. L.; Herad, C. L.; Schmidt, J. M.; *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, p. 6005.
85. Carmely, S.; Kashman, Y.; *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, p. 511.
86. Kobayashi, M.; Tanaka, J.; Katori, T.; Matsuura, M.; Kitagawa, I.; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, p. 2963.
87. Rinehart, K. L.; Harada, K.; Namikoshi, M.; Chen, C.; Harvis, C. A.; Munro, M. H. G.; Blunt, J. W.; Mulligan, P. E.; Beasley, V. R.; Dahlem, A. M.; Carmichael, W. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, p. 8557.
88. Carmichael, W. W.; *Handbook of natural toxins*, **1988**, *3*, p. 121.
89. Lewin, R. A.; Cheng, L.; *Prochloron*, **1989**.

90. Rinehart, K. L.; Kishore, V.; Bible, K. C.; Sakai, R.; Sullins, D. W.; Li, K. M.; *J. Nat. Prod.*, **1988**, *51*, p. 1.
91. Ohtani, I.; Moore, R. E.; Runnegar, M. T. C. *J. Am. Chem Soc.*, **1992**, *114*, p. 7942.
92. Harada, K.; Ohtani, I.; Iwamoto, K.; Suzuki, M.; Watanabe, M. F.; Terao, K. *Toxicol.*, **1994**, *32*, p. 73.
93. Banker, R.; Carmeli, S.; Hadas, O.; Teltsch, B.; Porat, R.; Sukenik, A. *Journal of Phycology*, **1997**, *33*, p. 613.
94. Eaglesham, G. K.; Norris, R. L.; Shaw, G. R.; Smith, M. J.; Chiswell, R. K.; Davis, B. C.; Neville, G. R.; Seawright, A. A.; Moore, M. R. *Environmental Toxicology*, **1999**, *14*, p. 151.
95. Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Gorham, P. R.; Hunter, N. R.; Pike, R. K.; Stavric, B. *Can. J. Chem.*, **1977**, *55*, p. 1367.
96. Matsunaga, Shigeki; Moore, Richard E.; Niemczura, Walter P.; Carmichael, Wayne W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, p. 8021.
97. Moore, R. E.; Scheuer, P. J.; *Science*, **1971**, *172*, p. 495.
98. Klein, L. L.; McWhorter, Jr. W. W.; Koss; Pfaff, K. P.; Kishi, Y.; Uemura, D.; Hirata, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, p. 7392.
99. Maeda, M.; Kodama, R.; Tanaka, T.; Yoshizumi, H.; Nomoto, K.; Takemoto, T.; Fujita, M.; *Symposium papers, Hiroshima*, **1985**, p. 616.
100. Yasumoto, T.; Yasumura, D.; Ohizumi, Y.; Takahashi, M.; Alcalá, A. C.; Alcalá, L. C.; *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, p. 163.
101. Fukui, M.; Murata, M.; Inoue, A.; Gawel, M.; Yasumoto, T.; *Toxicol.*, **1987**, *25*, p. 1121.
102. Haberman, E.; *Toxicol.*, **1989**, *27*, p. 1171.

103. Kao, C. Y.; Levinson, S. R.; *Tetrodotoxin, saxitoxin and the molecular biology of the sodium channel*, **1986**.
104. Bialojan, C.; Takai, A.; *Biochem. J.*, **1988**, 256, p. 283.
105. Hashimoto, K.; *Marine toxins and other bioactive marine metabolites*, **1979**.
106. Kaemper, E.; *The history of Japan, together with a description of the kingdom of Siam*.
107. Davis, W.; *Science*, **1988**, 240, p. 1715.
108. Noguchi, T.; Hashimoto; *Toxicon*, **1973**, 11, p. 305.
109. Mosher, H. S.; Fuhrman, F. A.; Buchwald, H. D.; Fischer, H. G.; *Science*, **1964**, 144, p. 1100.
110. Scheumack, D.; Howden, M. E. H.; Spence, I.; Quinn, R. J.; *Science*, **1978**, 199, p. 188.
111. Tsuda, K.; *Naturwissenschaften*, **1966**, 53, p. 171.
112. Yasumoto, T.; Yasumura, D.; Totsu, M.; Michishita, T.; Endo, A.; Kotaki, J.; *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, 50, p. 793.
113. Simidu, U.; Kita-Tsukamoto, K.; Yasumoto, T.; Yotsu, M.; *Int. J. System. Bacteriol.*, **1990**, 40, p. 331.
114. Noguchi, T.; Jeon, J. K.; Arakawa, O.; Sugita, H.; Deguchi, Y.; Shida, Y., Hashimoto, K.; *J. Biochem.*, **1986**, 99, p. 311.
115. Simidu, U.; Noguchi, T.; Hwang, D. F.; Shida, Y.; Hashimoto, K.; *Appl. Env. Microbiol.*, **1987**, 53, p. 714.
116. Matsui, T.; Taketsugu, S.; Kodama, K.; Ishii, A.; Yamamori, K.; Shimizu, C.; *Nippon, Suisan Gakkaishi*, **1989**, 55, p. 2199.

117. Kosuge, T.; Tsuji, K.; Hirai, K.; Fukuyama, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, p. 3059.
118. McMahon, T.; Silke, J.; *Harmful Algae News* **1996**, *14*, p. 2.
119. Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, p. 9967.
120. Ito, E.; Satake, Ofuji, K.; Kurita, N.; McMahon, T.; James, K.J.; *Toxicon*, **2000**, *38*, p.917.
121. Ito, E.; Terao, K.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *Harmful Algae. IOC of UNESCO*, **1988**, p. 588.
122. (a) Hu, T.; Curtis, J. M.; Oshima, Y.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A.; Watson-Wright, W. M.; Wright, J. L. C. *J. Chem. Soc. Commun.* **1995**, p. 2159. (b) Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, p. 7671.
123. Cembella, A. D.; Lewis, N. I.; Quilliam, M. A.; *Phycologia.* **2000**, *39*, p. 67.
124. Marasovic, I.; Pucher-Petkovic, T.; *Rapp Comm Int Mer Médit* **1985**, *29*, p.137.
125. Gawley, R. E., Rein, K. S., Kinoshita, M., Baden, D. G.; *Toxicon*, **1992**, *30* (7), p.780.
126. Holmes, M. J.; Lewis, R. J.; Jones, A.; Hoy, A. W., *Natural toxins*, **1995**, *3*(5), p. 355

2.3 Contaminazione di invertebrati marini

I molluschi bivalvi, i gastropodi, i granchi, le aragoste e altri invertebrati marini accumulano le biotossine sia per filtrazione diretta delle acque del mare e del plancton ivi disperso, come nel caso dei molluschi filtranti, sia per ingestione di organismi contaminati, come nel caso degli invertebrati carnivori e di quelli spazzini.

Il grado di contaminazione degli invertebrati è specifico per ogni specie e in genere è direttamente correlato alla concentrazione di cellule microalgali tossiche nel plancton.¹

Il grado di decontaminazione dipende, in primo luogo, dalla stagione e dalla temperatura delle acque:² basse temperature, infatti, ritardano l'eliminazione delle tossine, benché non sia del tutto noto il meccanismo con cui la temperatura influenza l'accumulo e l'eliminazione delle tossine.³ In secondo luogo, esso dipende dalla parte dell'organismo in cui le tossine vengono accumulate: quelle presenti nel tratto gastrointestinale sono eliminate più velocemente di quelle che invece si legano ad altri tessuti.

Ben poco è noto sul meccanismo di ritenzione delle tossine da parte di organismi carnivori gastropodi e da parte dei granchi. La gran parte delle informazioni riguardano invece i molluschi bivalvi, anche grazie alla diffusione sempre più ampia di allevamenti di tali animali.

E' noto, per esempio, che i mitili accumulano PSP tossine più velocemente di qualsiasi altra specie, ma al tempo stesso sono anche in grado di eliminarle molto rapidamente; le ostriche invece sono più lente ad accumulare sostanze tossiche, ma restano contaminate per un tempo più

lungo.⁴⁻⁵ I pettini, poi, riescono a ritenere le biotossine per un periodo di tempo che addirittura può superare i due anni.

Talune specie di bivalvi, come la *Mercenaria mercenaria*, hanno la capacità di evitare la contaminazione da dinoflagellati tossici.⁶ Infatti, nel 1972 durante una fioritura di *Alexandrium tamarense* lungo le coste del Massachusetts, la pesca fu interdetta a causa della forte contaminazione da PSP tossine. Addirittura, in quell'occasione saggi su campioni di molluschi rivelarono un contenuto di circa 3000-5000 µg di tossine per 100 g di molluschi, con massimo grado contaminazione nei mitili. Nessun campione di *Mercenaria mercenaria* o di ostriche, invece, risultava tossico. Studi successivi hanno dimostrato che la *Mercenaria mercenaria*, in presenza di *A. tamarense*, dapprima ritira il proprio sifone e poi si isola totalmente dall'ambiente circostante, chiudendo la valvola della conchiglia, finchè le acque non tornano pure. Non è escluso, che quest'organismo abbia la stessa reazione anche in presenza di altri dinoflagellati.

Oltre alle PSP-tossine anche altre sostanze tossiche sono accumulate dai molluschi filtranti, rappresentando un forte rischio per la salute pubblica.

Le DSP-tossine, come l'acido okadaico, le DTX, le PTX e la yessotossina, associate alla presenza di *Dinophysis spp.* e di *Prorocentrum spp.*, sono facilmente accumulate dai molluschi ma ben poco è noto sulla durata della contaminazione. Marcaillou-Le Baut *et al.* nel 1993 hanno confrontato le velocità di decontaminazione da DSP tossine di campioni di mitili, coltivati in acquacultura e in laboratorio, dimostrando che la decontaminazione avviene più velocemente nell'ambiente naturale che in laboratorio. Ciò suggerisce che la qualità del cibo disponibile per i mitili

durante la detossificazione è un fattore determinante per la velocità con cui le tossine vengono eliminate.

Più recentemente, è stato dimostrato che anche l'acido domoico e i suoi analoghi sono facilmente accumulati da organismi filtranti. Nel 1987, una misteriosa e grave intossicazione conseguente all'ingestione di *Mytilus edulis* coltivati, si verificò in Canada. I sintomi dell'avvelenamento includevano vomito, diarrea, confusione mentale, perdita della memoria, disorientamento e coma. Tre pazienti anziani morirono e altre vittime riportarono danni neurologici permanenti. L'acido domoico fu individuato come la sostanza responsabile dell'intossicazione e il termine amnesic shellfish poisoning (ASP) fu coniato per indicare l'insieme dei sintomi clinici.

In conclusione, si può affermare che le differenze nell'accumulo e nella ritenzione di tossine dipendono sia dalla natura dell'organismo contaminante che di quello contaminato, ma anche da altri fattori non ancora ben chiari. Di tali considerazioni, bisognerebbe tener conto sia nella scelta della specie da coltivare in acquacultura e sia del luogo ove collocarla, per limitare al massimo i danni derivanti da fioriture di alghe tossiche.

2.3.1 Procedure di detossificazione degli invertebrati

L'incremento degli *algal blooms* verificatosi negli ultimi decenni, richiede quindi una maggiore sorveglianza delle acque marine e la messa a punto di programmi internazionali, che si propongano di studiare e di gestire in modo adeguato le fioriture di alghe nocive e le loro gravi ripercussioni sull'ambiente, sull'economia e soprattutto sulla salute degli uomini. Il rischio delle intossicazioni si riduce, infatti, solo se si attuano controlli con le risposte

più rapide possibili e se il numero dei campioni controllati e' il più alto possibile.

Non esistono terapie specifiche contro le biotossine algali. Esse, infatti, essendo ionofore, colpiscono a livello cellulare il trasporto di ioni (pompa del sodio e del potassio). Nella maggior parte dei casi quello che si può fare e' eliminare i residui tossici dall'apparato digerente, qualora l'intossicazione sia colta nella fase iniziale, attraverso lavanda gastrica o con polveri di carbone attivo. Nei casi di paralisi respiratoria si può ricorrere anche alla respirazione artificiale. Per questo motivo, in Italia, il settore della produzione e immissione sul mercato dei molluschi bivalvi vivi (mitili o cozze, vongole, ostriche), destinati al consumo umano diretto o alla loro trasformazione prima del consumo, è disciplinato, per quanto riguarda gli aspetti sanitari, dal ***Decreto Legislativo 30 dicembre 1992 n°530*** recante attuazione della direttiva ***91\492\CEE***.

Il controllo sanitario del settore dei molluschi bivalvi si basa sul controllo delle acque di mare o di laguna dove questi animali sono allevati. In pratica, in ragione delle caratteristiche microbiologiche, chimiche, biotossicologiche dei molluschi pescati in una determinata zona, si procede alla classificazione della stessa zona di mare. Tale classificazione determinerà il destino produttivo e commerciale di questo prodotto. Attualmente sono previste 3 diverse tipologie di zone di allevamento e pesca dei molluschi:

ZONA A: prodotto destinato al consumo umano diretto (i molluschi devono possedere gli specifici requisiti sanitari previsti al Cap. V dell'allegato al sopracitato decreto legislativo n. 530\92).

ZONA B: prodotto destinato alla depurazione o alla stabulazione prima dell'immissione in commercio ai fini del consumo umano.

ZONA C: prodotto destinato ad una stabulazione di lunga durata ed a processi depurativi intensi o all'industria di trasformazione.

Il metodo di detossificazione più usato prevede il trasferimento dei molluschi tossici in acque prive di plancton tossico, per permettere l'autodepurazione. Tale metodo, tuttavia, non è applicabile a quegli invertebrati (ostriche, pettini) che hanno meccanismi di decontaminazione molto lenti.

Senza contare che il trasferimento di grosse quantità di molluschi da un'area contaminata ad un'altra non contaminata è al tempo stesso faticoso e molto dispendioso.

Per ridurre la contaminazione da PSP tossine, sono stati fatti tentativi di stratificazione dei mitili in una colonna d'acqua, ma l'esperimento ha avuto successo soltanto in presenza di alti livelli di tossicità.

Shock elettrici o l'impiego di cloro riducono la durata di contaminazione dei pettini;⁷ ma al tempo stesso alterano le proprietà organolettiche del prodotto, diminuendone l'appetibilità.

Recentemente è stato proposto l'impiego dell'ozono, ma al riguardo restano parecchi dubbi. Infatti, se da un lato è stata effettivamente registrata una diminuzione del grado di contaminazione da PSP tossine ad esempio nei molluschi esposti a fioriture di *A. tamarense*, *A. catenella* e *Gymnodinium breve*⁸⁻¹¹, dall'altro non si è avuto nessun risultato utile nel caso in cui la contaminazione era dovuta alla presenza di *Pyrodinium bahamense*. Inoltre, esperimenti condotti sui mitili hanno evidenziato come il trattamento con

ozono effettivamente prevenga l'accumulo di tossine da parte di tali molluschi, senza che vi sia alcuna alterazione dei mitili stessi. L'uso dell'ozono non ha, però, sicuramente successo in quelle specie di invertebrati che accumulano cisti di microrganismi o che legano le tossine ai propri tessuti per lunghi periodi di tempo.

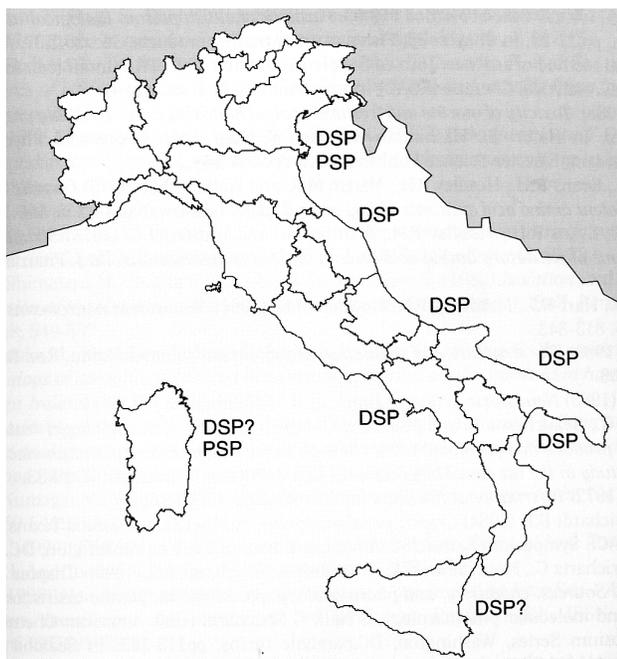
Al momento, comunque, non esistendo ancora un metodo di detossificazione efficace, rapido ed universale ed essendo ancora elevati i costi di simili trattamenti, si punta per lo più ad un costante e attento monitoraggio delle zone esposte a fioriture algali, e alla coltivazioni di specie che hanno tempi di decontaminazione più brevi, come i mitili, riducendo, invece, al minimo le coltivazioni di pettini e di ostriche.¹²

2.3.2 Le biotossine in Italia

L'incremento delle fioriture di dinoflagellati ed i conseguenti casi di avvelenamento per ingestione di molluschi contaminati, sono fenomeni che da più di un decennio si manifestano anche in Italia rappresentando motivo di seria preoccupazione per la salute pubblica. Non trascurabili sono anche i danni economici a tutta l'industria ittica che conseguono all'insorgere della tossicità; tutte le attività connesse alla pesca e all'allevamento di mitili eduli subiscono infatti un repentino arresto allorchè la tossicità si manifesta.

L'area responsabile del 90% della produzione italiana di mitili è situata lungo le coste dell'Adriatico settentrionale¹³ ed è proprio in queste zone, che incidenti di avvelenamento da DSP-tossine si sono verificati a partire dal 1989.¹⁴

Nel giugno di quell'anno, infatti, la presenza di cellule di *Dinophysis fortii* nelle ghiandole digestive di mitili raccolti nelle acque costiere dell'Emilia Romagna e l'isolamento di un estratto contenente non ben identificate DSP-tossine, suggerì che alcuni casi di diarrea nei consumatori di molluschi eduli non erano dovuti a contaminazioni batteriche o virali, ma ad intossicazioni da DSP tossine. Questa patogenesi, portata alla luce dal Centro di Ricerche Marine di Cesenatico, fu osservata in seguito nelle zone costiere delle Marche, del Veneto, dell'Abruzzo e del Friuli-Venezia Giulia.¹⁵



Distribuzione di DSP e PSP in Italia

La ricerca condotta nei laboratori di Cesenatico dal giugno 1989 al marzo 1991 con i fondi regionali dell'Emilia Romagna, secondo quanto prescritto dalla legislazione nazionale riguardo ai molluschi tossici, ha dimostrato che i livelli di DSP-tossine, presenti nei mitili delle zone costiere dell'Emilia, erano

tali da non permettere la vendita dei molluschi stessi per un periodo di ben otto mesi. Inoltre, il perdurare della tossicità per periodi consecutivi, da giugno 1989 a gennaio 1990 e da giugno 1990 a gennaio 1991, indicava che non ci si trovava dinanzi ad un problema occasionale, ed era assolutamente necessario far fronte ai rischi, al tempo stesso, economici e sanitari, che già erano fronteggiati in altri paesi della Comunità Europea.

Un gran numero di nazioni europee ha stabilito dei limiti di tolleranza per le DSP-tossine applicabili sia ai mitili prodotti in territorio nazionale sia a quelli importati; ma tali livelli variano fortemente da paese a paese, non essendo stati stabiliti, ad esempio, da organizzazioni internazionali come la *World Health Organization*. Nel frattempo in diversi stati europei, Italia compresa, sono stati introdotti per le DSP-tossine dei piani di sorveglianza, che prevedono l'analisi sistematica delle acque del mare, del fitoplancton, dei molluschi, al fine di individuare cellule di *Dinophysis* spp. e di enterotossine.

In quest'ambito, il gruppo di ricerca del Prof. E. Fattorusso ha intrapreso, nel 1992, uno studio sulle biotossine marine, che si realizza attraverso analisi periodiche dei molluschi coltivati presso le coste dell'Emilia Romagna, nei periodi di massima proliferazione algale.

E' stato, così, possibile stabilire che gli epatopancreas di *Mytilus galloprovincialis* tossici, raccolti agli inizi degli anni '90, contenevano quantità apprezzabili di acido okadaico, identificato mediante tecniche di spettroscopia NMR, in quantità superiori a 100 γ per 600 gr di epatopancreas. Questo risultato ha rappresentato la prima sicura evidenza di DSP-tossine lungo le coste italiane.

Negli anni successivi la tossicità da acido okadaico è stata gradualmente sostituita da quella da yessotossine. In quest'ambito è stata isolata la yessotossina^{16a} unitamente a suoi analoghi strutturalmente noti ma mai trovati in Italia quali la homo-YTX, la 45-OH-homo-YTX,^{16b} la 45-OH-YTX,^{16c} e derivati strutturalmente nuovi e mai isolati in precedenza quali l'adriatossina,^{16d} la carbossi-YTX,^{16e} e la carbossi-homo-YTX.^{16f}

L'acido okadaico, prima che venisse individuato in Italia nel 1992, era stato già riscontrato nei molluschi dell'Europa occidentale nel 1985 insieme al suo analogo DTX 1;¹⁷ mentre la yessotossina è apparsa nei mitili norvegesi nel 1988 insieme ad altre sostanze di natura acida.¹⁸ Le PTXs, invece, sono state tenute meno sotto controllo a causa di una mancanza di metodi routinari di rivelazione.¹⁹

In aggiunta alle DSP-tossine, che rappresentano la principale fonte di contaminazione dei mitili del mar Adriatico, anche le PSP-tossine sono state rivelate nel corso di analisi effettuate nel 1994, sollevando tutti i problemi associati all'avvelenamento da tale tipo di tossine.

Attraverso analisi HPLC FLD, è stata rinvenuta presso il nostro Dipartimento la presenza di due tossine della classe delle PSP, la gonyautossina 2 (GTX 2) e la gonyautossina 3 (GTX 3.). Non è stato chiarito quale fosse l'organismo responsabile della contaminazione dei mitili, anche se, tra le specie di dinoflagellati ritenuti produttori di PSP tossine, solo due sono state riscontrati nel mar Adriatico: l'*Alexandrium tamarense* e l'*Alexandrium minutum*. Una fioritura della prima specie ha avuto luogo lungo le coste dell'Emilia Romagna nel 1982,²¹ senza causare alcun fenomeno tossico, anche se si potrebbe supporre che nei campioni di mitili vi fossero concentrazioni

troppo basse di PSP per poter essere rivelate con i metodi chimici analitici dell'epoca. Per quanto riguarda, invece, l'*Alexandrium minutum*, anche se non sono stati ancora eseguiti degli studi sulla sua tossicità nel mar Adriatico,²² da analisi eseguite su ceppi Australiani è risultato che esso produce unicamente da GTX 1 e GTX 4.²³ L'assenza di C tossine come pure di STX e di NEO nei campioni Italiani analizzati fa supporre che proprio l'*Alexandrium minutum* è la probabile fonte di PSP tossine nel mar Adriatico.²⁰

2.3.3 Tenori massimi delle biotossine algali nei molluschi eduli

L'Unione Europea ha proposto normative sanitarie, limiti di tolleranza e metodi di analisi ufficiali per tutte le tossine responsabili delle intossicazioni alimentari conseguenti al consumo di molluschi eduli. In particolare, il Ministero della Salute Italiano ha sancito con decreto del 16 Maggio del 2002 i seguenti tenori massimi di biotossine algali nonché le metodiche per la loro determinazione:

“Il tenore massimo di acido okadaico è fissato a 160µg di equivalenti acido okadaico/kg”.

“Il tenore massimo di Yessotossina è fissato a 1mg di equivalenti Yessotossina/kg”.

“Il tenore massimo di PSP è fissato a 800µg di equivalenti Saxitossina/kg”.

“Il tenore di ASP nelle parti commestibili dei molluschi (corpo intero o parti commestibili separatamente) non deve superare i 20µg di acido domoico per grammo secondo il metodo di analisi HPLC”.

2.3.4 Riferimenti Bibliografici

1. Sribhibhadh, A.; *Thesis*, Univ. of Washington, **1963**.
2. Prakash, A.; Medcof, J. C.; Tennant, A. D.; *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, **1971**, 177, p. 87.
3. Madenwald, N. D.; *Toxic Dinoflagellates*, 1985, p. 479.
4. Desbiens, M.; Cembella, A. D.; *Proceedings of the 6th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Nantes, **1994**.
5. Shumway, S. E.; Sherman, S. A.; Cembella, A. D.; Selvin, R.; *Natural Toxins*, **1994**, 2, p. 236.
6. Shumway, S. E.; Cucci, T. L.; *Aquat. Toxicol.*, **1987**, 10, p. 9.
7. Kodama, M.; Ogata, T.; Sato, S.; Inoguchi, N.; Shimizu, M.; Daido, H.; *Toxicon*, **1989**, 27, p. 55.
8. Thurberg, F. P.; *Aquatic Application of Ozone*, **1975**, p. 50.
9. Blogoslawski, W.; Brown, C.; Rhodes, E.; Broadhurst, M.; *Proc. First Inter. Symp. On Ozone for Water and Wastewater Treatment*, New York, **1975**, p. 684.
10. Dawson, M. A.; Thurberg, F. P.; Blogoslawski, W.; Sasner, J. J.; Ikawa, M.; *Proc. Fourth Food-Drug from the Sea Conference*, Washington, **1976**, p. 152.
11. Blogoslawski, W.; Stewart, M. E.; *Mar. Biol.*, **1978**, 45, p. 261.
12. Shumway, S. E.; Sherman-Caswell, S.; Hurst, J. W.; *J. Shellfish Res.*, **1988**, 7, p. 643.
13. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Satake, M.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Toxicon*, **1997**, 35, p. 177.

14. Boni, L.; Mancini, L.; Milandri, A.; Poletti, R.; Pompei, M.; Viviani, R.; *International Conference on Marine Toxins*, Bologna, **1990**.
15. Fattorusso, E.; *Tossine in alimenti marini*, Napoli, **1993**.
16. (a) Fattorusso, E.; Ciminiello, P.; Costantino, V.; Magno, S.; Mangoni, A.; Milandri, A.; Poletti, R.; Pompei, M.; Viviani, R.; *Mar. Poll. Bull.* **1992**, *24*, 234. (b) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Satake, M.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Toxicon* **1997**, *35*, 177. (c) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Toxicon* **1999**, *37*, 689. (d) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8897. (e) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2*, 291. (f) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 770.
17. Dahl, E.; Yndestad, M.; *Toxic Dynoflagellates*, **1985**, p. 495.
18. Lee, J.; Tangen, K.; Dahl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T.; *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1988**, *54*, p. 1953.
19. Krogh, P.; *Report of the Scientific Veterinary Committee on DSP in Europe*. **1990**.
20. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Oshima, Y.; Poletti, R.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Marine Pollution Bulletin*, **1995**, *30*, p. 733.
21. Boni, L.; *Inf. Bot. It.*, **1983**, *15*, p. 18.
22. Honsell, G.; *Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea*, **1993**, p. 127.
23. Oshima, Y.; Hirota, M.; Yasumoto, T.; Hallegraeff, G.; Blackburn, S.; Steffensen, D.; *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1989**, *55*, p. 925.

Capitolo 3

Presentazione del lavoro svolto

L'attività di ricerca che ho svolto durante i tre anni di dottorato presso il Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, ha riguardato la chimica delle biotossine marine, filone di ricerca da anni investigato dal gruppo del prof. Fattorusso. Tale tematica risulta di notevole rilevanza sia dal punto di vista igienico-sanitario che economico poichè ogni anno, l'industria ittica subisce repentine interruzioni della propria attività a causa dell'insorgere di tossicità da biotossine nei mitili. Il mio lavoro si è focalizzato sugli aspetti analitici del problema, infatti, con particolare riferimento alla tecnica LC-ESI-ion trap- MS e LC- TIS- triple quad- MS, mi sono occupata dello studio di tossine appartenenti alle classi delle DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*), ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*) e degli Spirolidi (*Fast Acting Toxins*). Ho dunque analizzato non solo campioni di mitili contaminati (responsabili del trasferimento della tossicità all'uomo) ma anche campioni di cellule (reali sintetizzatori delle tossine in questione) sia in retinata che in coltura. Ho messo a punto una metodica HILIC-MS basata sull'accoppiamento della cromatografia liquida ad interazioni idrofiliche e la spettrometria di massa, che permette la rivelazione e quantizzazione contemporanea, anche al di sotto dei limiti previsti dalla legge, di Acido Domoico (tossina amnesica, ASP) e delle tossine paralitiche (PSP), tenendo conto dell'effetto matrice, sempre correlato alla rivelazione LC-MS. Attraverso questa metodica ho messo in luce, per la prima volta nei mitili coltivati nel mar Adriatico, la presenza di acido domoico, che complica ulteriormente il profilo tossicologico dei mitili coltivati nei nostri

mari. Ciò rende necessario l'inserimento dell'acido domoico nel panorama di tossine da monitorare nei *Mytilus galloprovincialis* italiani.

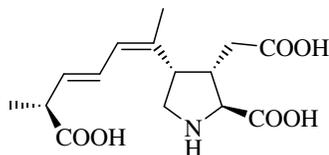
Inoltre ho contribuito all'identificazione di una nuova specie tossica della diatomea *Pseudonitzschia*, la *Pseudonitzschia galaxiae* del golfo di Napoli, che, grazie alla sensibilità del metodo su menzionato, è risultata produttrice di acido domoico.

Mi sono occupata anche dell'indagine LC-MS di un ceppo del dinoflagellato *Alexandrium ostenfeldii* proveniente dal mar Adriatico che si è rivelato produttore di una tossina mai prima d'ora riscontrata nei mari italiani: lo spirolide 13-desMe-C, appartenente ad una classe di tossine ad azione rapida. Inoltre, via LC-MS ho evidenziato dallo stesso ceppo, la presenza di 3 nuovi spirolidi, riscontrati però in tracce, che non hanno consentito la completa elucidazione strutturale. Ho poi analizzato, ancora attraverso la tecnica LC-MS, colture del dinoflagellato *Protoceratium reticulatum* cresciuto in diverse condizioni di salinità, indagando gli effetti che tale parametro induce sulla produzione e rilascio nel mezzo di coltura di yessotossine (tossine cardiotoxiche) evidenziando una diminuzione della YTX rilasciata nel mezzo, all'aumentare della salinità. Infine ho analizzato via LC-MS un ceppo del dinoflagellato *Prorocentrum lima* raccolto dall'Adriatico mettendo in luce la presenza dell'acido okadaico (tossina diarroica e tumor-promoter) e della dynofisistossina-1 insieme ai quali ho rivelato una serie di derivati esterei, tra cui alcuni noti ed altri sconosciuti.

3.1 Determinazione dell'acido domoico mediante cromatografia liquida ad interazioni idrofiliche-spettrometria di massa (HILIC-MS)

L'acido domoico (DA) è la biotossina marina responsabile dell'avvelenamento amnesico da molluschi o sindrome ASP. Il primo evento documentato di tossicità da ASP risale al 1987, quando 153 persone furono vittime di un'intossicazione acuta in seguito al consumo di mitili coltivati nella zona di Prince Edward Island (Canada). I sintomi di tale intossicazione compaiono nell'arco di 24 ore ed includono nausea, vomito, gastroenterite, crampi e diarrea. Disturbi neurologici quali atassia, confusione, persistente perdita di memoria a breve termine fino al coma, si verificano generalmente dopo 48 ore dal consumo dei molluschi contaminati.¹

Il meccanismo d'azione del DA si spiega sulla base della sua somiglianza strutturale con il neurotrasmettitore eccitatorio acido glutammico rispetto al quale presenta però maggiore affinità recettoriale; l'acido domoico, infatti si lega in prevalenza ai recettori dell'N-metil-D-aspartato (NMDA) a livello del sistema nervoso centrale, provocando depolarizzazione neuronale ed in seguito, un incremento della permeabilità degli ioni Ca^{++} che conduce a disfunzione o addirittura morte cellulare².



Acido Domoico

La rivelazione dell'acido domoico nei molluschi può essere effettuata attraverso sia saggi biologici che metodi strumentali³. Il saggio biologico sul topo per le PSP tossine previsto *dall'Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) può essere impiegato per la rivelazione della tossicità da acido domoico⁴. Tale metodica prevede la bollitura del tessuto di mollusco con un ugual volume di HCl 0,1M, ottenendo la contemporanea estrazione dell'acido domoico e delle PSP tossine. L'iniezione intraperitoneale dell'estratto acido di molluschi contenenti acido domoico nel topo induce una sintomatologia molto caratteristica, che comprende sedazione-acinesia, rigidità, perdita del controllo posturale, convulsioni e morte⁵.

Tuttavia, questi sintomi possono essere osservati solo quando l'acido domoico è presente a livelli superiori a 40µg/g di tessuto edibile, laddove il limite massimo previsto dalla legge di acido domoico è 20µg/g di tessuto di mollusco. Dunque, la relativa scarsa sensibilità di questo saggio ne preclude il suo impiego a scopi regolatori.

Per la rivelazione sensibile dell'acido domoico si preferiscono dunque metodi strumentali⁶. In particolare la cromatografia liquida con rivelazione UV (LC-UV) è la tecnica analitica di elezione per la determinazione dell'acido domoico nei molluschi^{7,8}. Il tessuto di mollusco può essere estratto sia attraverso la procedura AOAC descritta precedentemente⁷, o con una soluzione metanolo/acqua (1:1; v/v)⁸, che offre una migliore resa e una maggior stabilità della tossina nell'estratto. Una porzione dell'estratto viene poi iniettata in un sistema HPLC con rivelatore UV.

Il limite di rivelazione per l'acido domoico ottenuto con questa metodica è compreso tra 0,1 e 1µg DA/g di tessuto, ed è funzione della sensibilità del

rivelatore UV. Dal momento che il limite di rivelazione è ben inferiore al massimo livello di DA previsto dalla legge questo rappresenta il metodo ufficiale, utilizzato a livello regolatorio, per la rivelazione delle ASP tossine. Sfortunatamente, utilizzando tale metodo si va incontro a numerose interferenze, che possono dare falsi positivi nell'analisi di estratti grezzi. In particolare, il triptofano e suoi derivati, comunemente contenuti nei molluschi, nelle condizioni cromatografiche impiegate, eluiscono a tempi di ritenzione simili all'acido domoico rendendo ambigua l'interpretazione dei risultati. Per evitare questi inconvenienti, si preferisce effettuare una purificazione dell'estratto grezzo tramite estrazione in fase solida a scambio anionico forte (SAX SPE)⁸.

Un'altra metodica applicata per la determinazione dell'acido domoico nei molluschi, è l'elettroforesi capillare (CE) con rivelazione UV, ma in questo caso sono necessari due step SPE di purificazione per ottenere risultati affidabili ed interpretabili^{9,10}.

In tempi recenti sono state inoltre sviluppate procedure sensibili basate sulla derivatizzazione con 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) seguita da analisi cromatografica con rivelazione a fluorescenza per il monitoraggio dell'acido domoico nelle matrici marine¹¹. Tuttavia, queste metodiche risultano difficoltose per l'analisi di tessuti di molluschi a causa delle interferenze della matrice in caso di derivatizzazione.

La rivelazione di tossine basata sull'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (LC/MS) è diventata la principale tecnica per lo screening di molluschi grazie alla sua elevata sensibilità e specificità. Infatti di recente sono stati sviluppati metodi LC-MS per la maggior parte delle

biotossine marine note¹². La tecnica LC/MS viene impiegata per l'analisi rapida ed altamente selettiva dell'acido domoico in estratti grezzi. Quilliam et al., hanno dimostrarono la potenzialità della tecnica di ionizzazione electrospray (ESI)-MS per la conferma dell'acido domoico ed altre tossine in estratti di molluschi bivalvi¹³. A tale proposito sono stati proposti diversi metodi reversed-phase (RPLC)/ESI-MS per la rivelazione dell'acido domoico¹⁴⁻¹⁸.

Si deve notare che, a causa della frequente copresenza all'interno di campioni di molluschi contaminati di numerose tossine sia appartenenti ad una stessa classe che a classi differenti, la tendenza è quella di sviluppare metodi per la determinazione contemporanea di più tossine. Le PSP tossine, ad esempio, possono essere coestratte con l'acido domoico qualsiasi sia la procedura di estrazione utilizzata. Di conseguenza, è particolarmente importante sviluppare una metodica che permetta l'analisi combinata delle PSP tossine e dell'acido domoico.

Sulla base di queste considerazioni, è stata valutata la possibilità di mettere a punto una metodica analitica LC-MS per la rivelazione specifica, selettiva e contemporanea dell'acido domoico e delle PSP tossine. Recentemente, Dell'Aversano et al. hanno proposto la tecnica di accoppiamento cromatografia liquida ad interazioni idrofiliche/spettrometria di massa (HILIC/MS) per l'analisi delle PSP tossine e delle tossine cianobatteriche in diverse matrici biologiche^{19,20}.

Parte del mio lavoro di tesi ha riguardato la sperimentazione dell'applicabilità di questa tecnica alla rivelazione e quantificazione dell'acido domoico, con l'obiettivo di impiegare tale tecnica all'analisi contemporanea dell'acido domoico e delle PSP tossine.

3.1.1 Risultati

Ottimizzazione dei parametri di massa

I primi esperimenti sono stati registrati su uno spettrometro di massa turbo ion spray (TIS) con analizzatore a triplo quadrupolo (API 2000) in modalità *full scan-MS* (FS-MS), utilizzando una soluzione standard di acido domoico commercialmente disponibile alla concentrazione di 1µg/ml. E' stata sfruttata la natura amminoacidica dell'acido domoico registrando spettri FS-MS sia in modalità a ioni positivi che negativi.

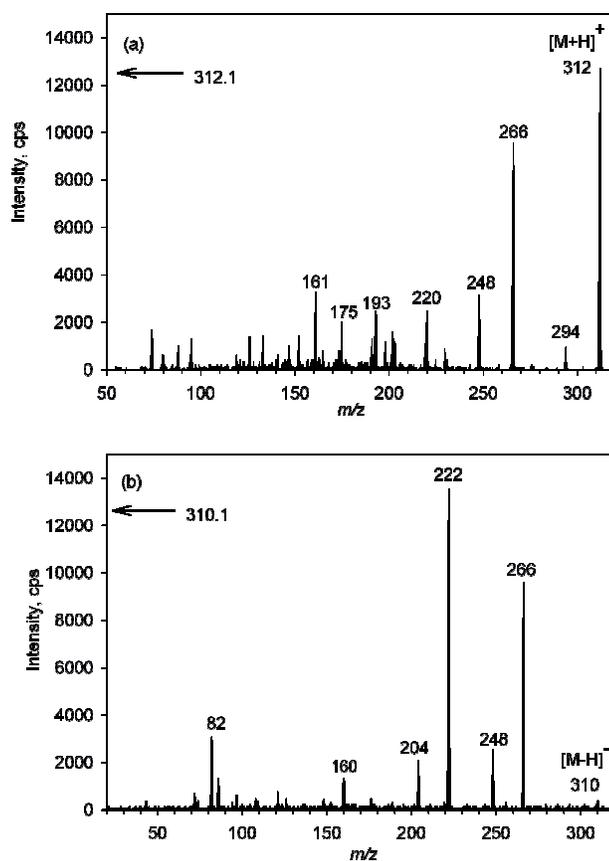
Tali spettri sono stati ottenuti in modalità *Flow Injection Analysis* (FIA), iniettando nel flusso della fase mobile 1-5µl di soluzione standard del composto in esame. Lo spettro *full scan-MS* (FS-MS) ha mostrato la presenza di uno ione $[M+H]^+$ a m/z 312 ed un addotto con il sodio a m/z 334 in modalità a ioni positivi, e la presenza di uno ione $[M-H]^-$ a m/z 310 in modalità a ioni negativi. Nelle condizioni utilizzate non è stata osservata nessuna frammentazione significativa.

I risultati di tali esperimenti sono stati utilizzati per selezionare gli ioni da osservare in esperimenti *Selected Ion Monitoring* (SIM). Tutti i parametri di sorgente (*Declustering potential*, DP; *Focusing Potential*, FP; *Entrance Potential*, EP) sono stati ottimizzati accuratamente al fine di ottenere il massimo della sensibilità.

Sono stati dunque effettuati esperimenti SIM monitorando gli ioni predominanti $[M+H]^+$ a m/z 312, $[M+Na]^+$ a m/z 334 e $[M-H]^-$ a m/z 310 in maniera da ottimizzare tutti i parametri di sorgente: DP, FP, EP e T al fine di

ottenere la massima corrente ionica e quindi la più alta sensibilità per la rivelazione dell'acido domoico.

Successivamente, gli ioni $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$ sono stati selezionati come ioni precursori in esperimenti di massa/massa (FS-MS/MS) rispettivamente a ioni positivi e negativi, investigando l'energia di collisione appropriata che permettesse di ottenere contemporaneamente un adeguato grado di frammentazione e una buona sensibilità di rivelazione dell'acido domoico.



Spettro MS/MS dell'acido domoico in modalità (a) ioni positivi e (b) negativi, utilizzando un'energia di collisione di 25 eV.

Il pattern di frammentazione prodotto nello spettro MS/MS dello ione $[M+H]^+$ consisteva principalmente in diverse perdite di H_2O e CO (o $HCOOH$).

In particolare, venivano osservati i seguenti ioni: m/z 294 $[M+H-H_2O]^+$, 266 $[M+H-HCOOH]^+$, 248 $[M+H-HCOOH-H_2O]^+$, 220 $[M+H-HCOOH-H_2O-CO]^+$, 193 $[M+H-HCOOH-H_2O-CO-HCN]^+$, e 175 $[M+H-HCOOH-2H_2O-CO-HCN]^+$.

Lo spettro MS/MS a ioni negativi conteneva invece frammenti dovuti a perdite successive di CO_2 e H_2O dallo ione $[M-H]^-$. Venivano osservati i seguenti ioni: m/z 266 $[M-H-CO_2]^-$, 248 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 222 $[M-H-2CO_2]^-$, 204 $[M-H-2CO_2-H_2O]^-$, 160 $[M-H-3CO_2-H_2O]^-$, e 82 $[M-H-228]^-$.

Le informazioni fornite dagli esperimenti MS/MS sono state usate per mettere a punto esperimenti di tipo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) in entrambe le modalità di ionizzazione.

Le seguenti transizioni ione precursore > ione frammento sono state selezionate per gli esperimenti MRM a ioni positivi: m/z 312 > 294; m/z 312 > 266; m/z 312 > 248; m/z 312/ > 220; m/z 312/ > 193; m/z 312 > 175.

Le seguenti transizioni ione precursore/ione frammento sono state selezionate per gli esperimenti MRM a ioni negativi: m/z 310 > 266; m/z 310/ > 248; m/z 310 > 222; m/z 310 > 204; m/z 310 > 160; m/z 310 > 82.

Esperimenti MRM a ioni positivi e negativi sono stati poi condotti ottimizzando i valori di energia di collisione (CE), potenziale in uscita dalla cella di collisione (CXP) e gas di collisione (CAD) in modo da consentire la più sensibile rivelazione dell'acido domoico in termini di rapporto segnale rumore (S/N).

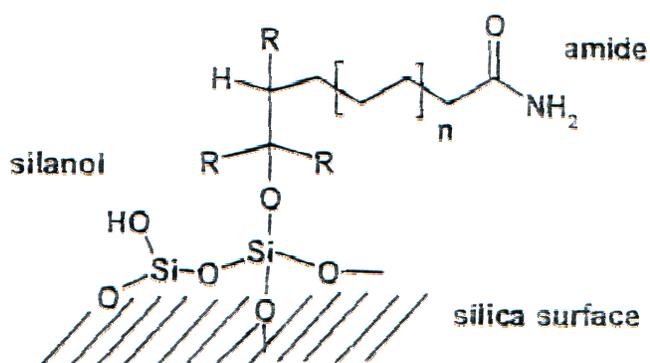
Esperimenti analoghi a quelli sopra riportati sono stati registrati su di uno spettrometro di massa elettrospray con analizzatore a trappola ionica (LCQ Classic) in modalità a ioni positivi e negativi. Gli spettri *full scan-MS* sono stati registrati nel range di massa compreso tra 150-500 mostrando l'esclusiva

presenza dello ione $[M+H]^+$ a m/z 312 lavorando a ioni positivi e lo ione $[M-H]^-$ a m/z 310 in modalità a ioni negativi. Lo spettro MS/MS, invece, è stato acquisito selezionando come ione precursore lo ione $[M+H]^+$ e lo ione $[M-H]^-$ rispettivamente in modalità a ioni positivi e negativi impiegando una energia di collisione del 30%. I pattern di frammentazione osservati in entrambe le modalità di ionizzazione risultavano sovrapponibili a quelli ottenuti impiegando l'analizzatore a triplo quadrupolo.

Ottimizzazione dei parametri cromatografici

E' stata utilizzata una fase stazionaria di tipo *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC), un tipo di cromatografia liquida relativamente nuova utile nella separazione di composti polari^{21,22}.

Essa utilizza una fase stazionaria in cui i gruppi silanolicci sono derivatizzati con lunghe catene alchiliche che terminano con funzioni ammidiche, e come fase mobile una soluzione acquosa ricca in solvente organico, che di fatto incrementa la ionizzazione degli analiti.



Fase stazionaria HILIC, Amide 80

Non sono necessari agenti in grado di formare coppie ioniche (ion-pairing) per garantire una sufficiente ritenzione degli analiti sulla colonna; di

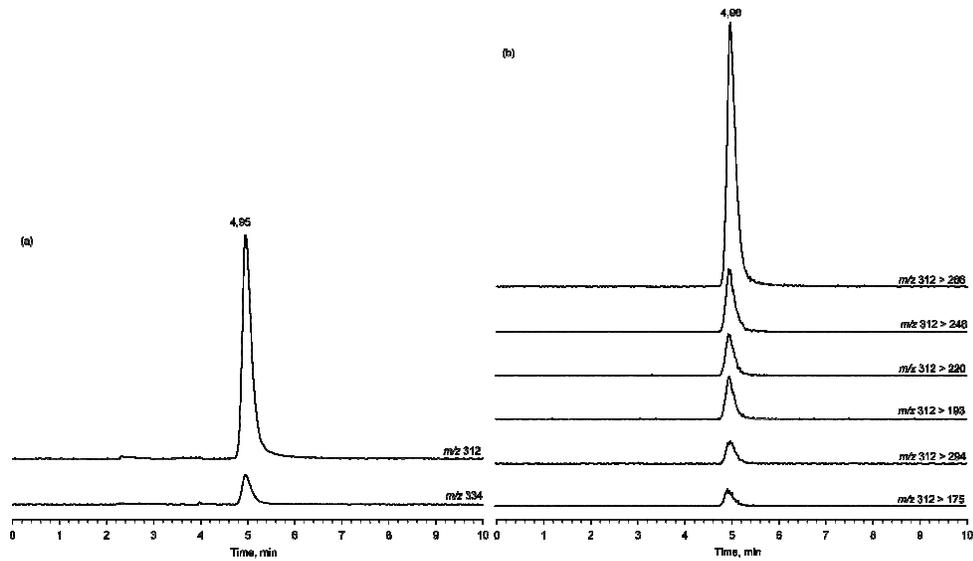
conseguenza vengono evitati gli effetti negativi che tali agenti hanno sull'efficienza di ionizzazione.

Il meccanismo di separazione nell'HILIC include interazioni di scambio ionico e interazioni idrofiliche che si generano tra uno strato acquoso stagnante alla superficie della fase stazionaria e la fase mobile.

L'HILIC si comporta come una cromatografia a fase diretta, in cui i tempi di ritenzione degli analiti aumentano all'aumentare della percentuale di solvente organico utilizzato.

Per l'analisi delle PSP tossine il metodo HILIC/MS prevede l'uso di una colonna 5 μ m TSK gel Amide 80, 2x250mm (Tosohaas, PA, USA) eluita socraticamente a 65%, di B con A=H₂O e B=95% ACN entrambe addizionate di un tampone 2,0mM HCOO⁻ NH₄⁺/3.6mM HCOOH (pH=3.55)²⁰. In queste condizioni tutte le PSP tossine possono essere determinate in un'analisi di 30 minuti con un alto grado di selettività e sensibilità.

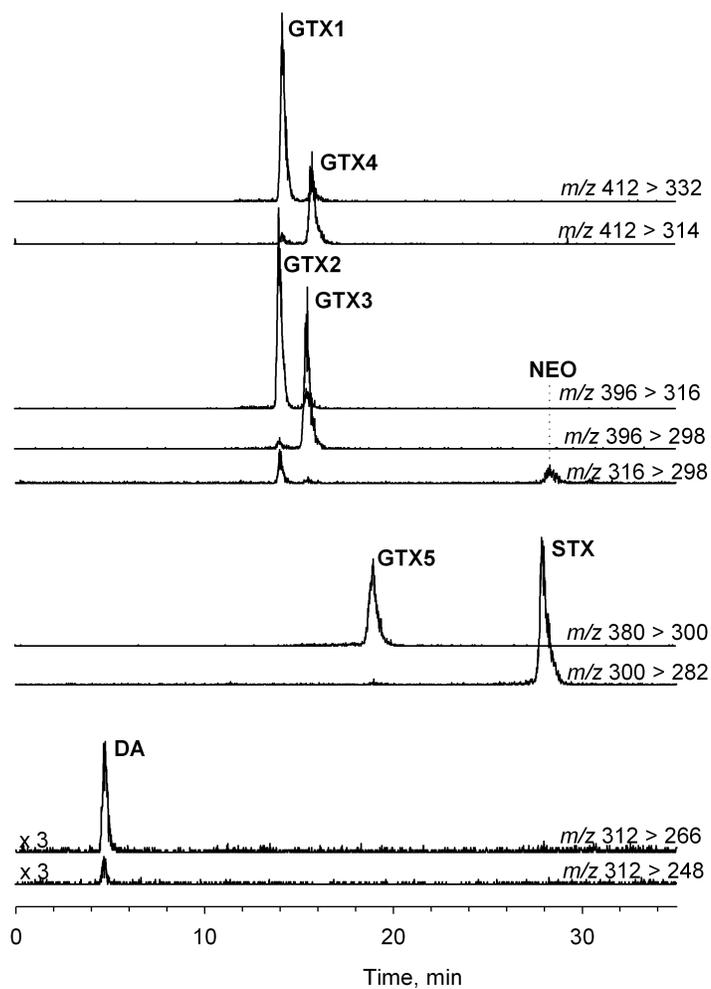
Al 65% B l'acido domoico eluiva al fronte, per cui è stata necessaria una percentuale maggiore di solvente organico pari al 75% di B, al fine di ottenere un'accettabile ritenzione su colonna per l'acido domoico, che così eluiva a 4,96 minuti. In figura sono mostrate le tracce SIM e MRM in modalità ioni positivi per uno standard di acido domoico 1.1 μ g/ml. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in modalità ioni negativi.



Analisi HILIC/MS di una soluzione standard di DA 1.1 µg/ml in modalità a ioni positivi. L'esperimento SIM (a) è stato effettuato selezionando gli ioni $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. L'esperimento MRM (b) è stato realizzato selezionando transizioni ioniche in accordo con il pattern di frammentazione dello ione $[M+H]^+$ dell'acido domoico. È stata utilizzata una eluizione isocratica come riportato nella parte sperimentale.

L'analisi combinata dell'acido domoico e delle PSP tossine è stata realizzata invece utilizzando un'eluizione a gradiente. Una miscela standard contenente DA e alcune PSP tossine (GTX2, GTX3, GTX1, GTX4, GTX5, STX, NEO) è stata quindi analizzata in HILIC/MS modalità MRM a ioni positivi selezionando le seguenti transizioni di ioni, in accordo con i pattern di frammentazione delle tossine analizzate: m/z 312 > 266 e 312 > 248 per l'DA ($R_t=4.69$ min); m/z 412 > 314 e 412 > 332 per la GTX1 ($R_t=14.17$) e GTX4 ($R_t=15.79$); m/z 396 > 298 e 396 > 316 per la GTX2 ($R_t=14.04$) e GTX3 ($R_t=15.51$); m/z 316 > 298 per GTX2, GTX3 e NEO ($R_t=28.33$); m/z 380 > 300

per GTX5 ($R_t=19.00$); e m/z 300 > 282 per GTX5 e STX ($R_t=27.86$). E' stato utilizzato un gradiente di eluizione come riportato nella parte sperimentale.



Limiti di rivelazione

Lo standard di acido domoico sciolto in metanolo è stato analizzato in triplicato a cinque livelli di concentrazione (10; 3.3; 1.11; 0.37 e 0.123 μ g/ml). Esperimenti SIM ed MRM sono stati effettuati sia in modalità ioni positivi che negativi. Le medie delle analisi effettuate in triplicato sono state utilizzate per

costruire le curve di calibrazione; le aree dei picchi sono state utilizzate per esprimere la risposta dell'analita. Il limite di rivelazione per lo standard della tossina pura, non in matrice è risultato 17pg (S/N=3) in modalità MRM a ioni positivi (m/z 312 > 266) e 10pg in modalità SIM a ioni negativi. In tutti gli esperimenti i coefficienti di correlazione sono risultati >0.9994, indicando un alto livello di linearità delle curve all'interno del range di concentrazioni testate.

| Experiment | Ione | LOD (ng/ml) | LOQ (ng/ml) | r ² |
|------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| SIM(+) | 312 | 3 | 11 | 0.9998 |
| | 334 | 14 | 47 | |
| MRM (+) | 312 > 266 | 3 | 11 | 0.9999 |
| | 312 > 248 | 5 | 18 | 0.9999 |
| | 312 > 220 | 8 | | |
| | 312 > 193 | 10 | | |
| | 312 > 175 | 23 | | |
| | 312 > 294 | 30 | | |
| SIM(-) | 310 | 2 | 7 | 0.9999 |
| MRM (-) | 310 > 222 | 10 | 32 | 0.9994 |
| | 310 > 266 | 10 | 34 | 0.9996 |
| | 310 > 160 | 79 | | |
| | 310 > 248 | 49 | | |
| | 310 > 204 | 82 | | |
| | 310 > 82 | 75 | | |

Limiti di rivelazione (LOD, S/N=3) e limiti di quantificazione (LOQ, S/N=10) per l'acido domoico determinati attraverso HILIC/MS in esperimenti SIM e MRM.

Esperimenti *full scan*-MS sono stati inoltre registrati su un sistema HILIC/ion trap MS utilizzando una soluzione standard di acido domoico in metanolo a tutti i livelli di concentrazioni menzionati. I limiti di rivelazione strumentale per l'acido domoico utilizzando questo sistema sono risultati 250 e 77 ng/ml, rispettivamente, in modalità *full scan*-MS a ioni positivi e negativi.

Valutazione dell'effetto matrice

Molti studi riportano che le principali fonti di problemi analitici nell'LC-MS, derivano dagli effetti negativi dovuti alla matrice, ovvero alla significativa influenza della stessa sulla ionizzazione degli analiti.

Il più importante di questi effetti è il fenomeno della **soppressione ionica** che, probabilmente, rappresenta una delle più importanti insidie che si riscontrano nell'analisi di matrici biologiche complesse in LC-MS.

Il fenomeno della soppressione ionica in LC-MS è dovuto a svariate cause:

- La prima, ampiamente descritta in letteratura, riguarda la presenza di sostanze endogene nell'estratto finale del campione come ad esempio, specie ioniche riconducibili a elettroliti inorganici, sali e tamponi; composti altamente polari come fenoli e pigmenti; varie molecole organiche quali carboidrati, ammine, urea, lipidi, peptidi, composti analoghi o metaboliti con una struttura chimica simile a quella dell'analita di interesse.

- La seconda, generalmente meno descritta, riguarda la presenza di composti esogeni che possono essere veicolati dall'equipaggiamento di laboratorio o dai consumabili, inclusi residui di plastica e polimeri (ftalati), prodotti di degradazione dei detergenti (alchilfenoli), reagenti di coppia ionica, residui del calibrante, materiali rilasciati dalle fasi stazionarie o dai solventi, impurità del vetro.

Nel caso della LC-MS, differenti meccanismi sono stati proposti per spiegare il fenomeno della soppressione ionica:

- Il primo meccanismo riguarda il decremento dell'efficienza dell'evaporazione dovuta ai componenti della matrice. Infatti, la presenza di

interferenti in concentrazione elevata può incrementare la viscosità e la tensione di superficie delle gocce prodotte nella sorgente e la riduzione della capacità degli analiti di reagire con la fase gassosa. La co-precipitazione degli analiti con il materiale non volatile, come le macromolecole, può ugualmente essere un limite per gli stessi al loro trasferimento nella fase gassosa.

- Il secondo meccanismo riguarda la competizione tra gli analiti e gli interferenti nei riguardi della massima efficienza di ionizzazione. Ad esempio, per una buona ionizzazione in ESI il valore ottimale conosciuto della concentrazione delle piccole molecole organiche, è di 10^{-5} M.

- L'ultimo possibile meccanismo è insito nella fase gassosa e riguarda i processi di neutralizzazione, i quali sono seguiti da una relativa basicità nella fase gassosa sia degli analiti che degli interferenti con conseguenze sulla stabilità degli ioni prodotti.

Le conseguenze della soppressione ionica sono numerose:

- Una diretta influenza sul segnale dell'analita di interesse ma non in modo continuo e perfettamente riproducibile; di conseguenza, la sensibilità, la ripetibilità, la linearità e l'accuratezza possono essere tutte insieme alterate.
- Un disturbo sullo spettro di massa che può portare ad una interpretazione non corretta attraverso l'elaborazione MS standard.
- Una severa soppressione ionica può condurre ad una totale soppressione del segnale dell'analita di interesse con il rischio di falsi negativi come conseguenza (analita non identificato a dispetto della sua presenza o concentrazione apparente intorno al minimo limite di rivelazione).

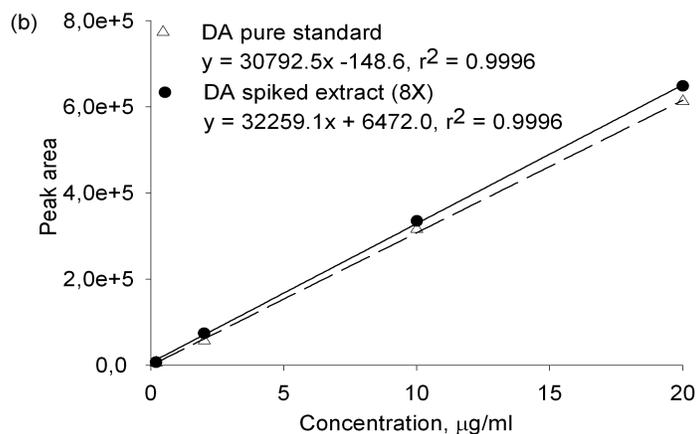
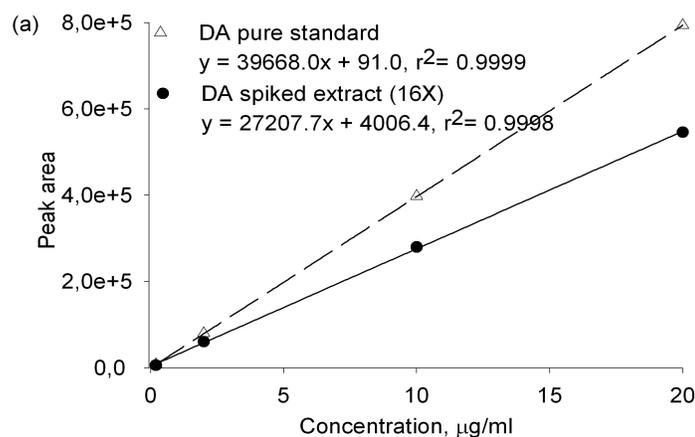
Per stabilire se c'era qualche effetto di potenziamento o di soppressione ionica per l'acido domoico dovuto alla presenza di sostanze coestratte, abbiamo

effettuato l'estrazione di un campione di mitili non contaminati usando metanolo/acqua (1:1), e l'estratto grezzo (1g/ml) è stato contaminato con acido domoico (20µg/ml) equivalente al limite regolatorio previsto dalla legge. Le analisi MRM dell'estratto contaminato e di una soluzione standard di acido domoico (20µg/ml) sono state effettuate in triplicato. Il confronto dei risultati ha mostrato il 53% di soppressione ionica nell'intensità del segnale in modalità ioni positivi e la soppressione del 3% in modalità a ioni negativi.

L'effetto matrice osservato in modalità a ioni positivi è quindi apparso significativo, e per cui si è reso necessario stabilire un livello di matrice che potesse ridurre al minimo l'effetto di soppressione. Al contrario l'interferenza della matrice in modalità a ioni negativi era trascurabile, per cui la quantificazione di acido domoico presente in un estratto grezzo di 1g/ml può essere considerato affidabile se effettuata utilizzando come standard esterno una soluzione di acido domoico puro. Tuttavia, la forma del picco appariva slargata con un significativo scodamento del picco. Ciò rendeva necessario un qualche miglioramento anche in modalità a ioni negativi. Di conseguenza, sono stati preparati sei livelli di diluizione di matrice dall'estratto contaminato 1g/ml utilizzando metanolo/acqua (1:1) e queste sono state analizzate in modalità MRM.

Il rapporto area del picco/Q è stato diagrammato rispetto a Q (Q = quantità di tessuto equivalente iniettato). I livelli ottimali di diluizione della matrice sono stati 0.0625 e 0.125g/ml, rispettivamente in modalità a ioni positivi e negativi, suggerendo che non c'è nessuna reale necessità di evaporare l'estratto. Gli estratti di campioni non contaminati a queste concentrazioni di matrice sono stati usati per preparare standard di acido domoico in matrice a quattro livelli di

concentrazione. Successivamente, sono state costruite curve di calibrazione per gli standard puri e per quelli all'interno della matrice in modalità MRM positiva (a) con la matrice a concentrazione di 0.0625g/ml impiegando la transizione m/z 312 > 266 e negativa (b) con la matrice a concentrazione di 0.125g/ml utilizzando la transizione m/z 310 > 266. Ogni punto è la media di tre analisi replicate.



E' stata osservata in tutti i casi una buona linearità. In modalità ioni negativi la pendenza della curva per gli standard in matrice si è rivelata analoga a quella degli standard puri, e si osservava un leggero effetto di potenziamento della ionizzazione nell'estratto contaminato. Operando in modalità ioni positivi

è stata osservata una notevole soppressione del segnale nonostante l'ulteriore diluizione della matrice, suggerendo che gli standard combinati con la matrice devono essere usati in modalità ioni positivi per un'accurata analisi quantitativa.

I limiti di rivelazione per l'acido domoico nel tessuto sono risultati 63 e 190 ng/g, rispettivamente, in esperimenti in modalità MRM a ioni positivi e negativi.

Conclusioni

E' stato sviluppato quindi un metodo HILIC/MS che permette la rapida e chiara identificazione e quantizzazione di acido domoico (DA) in campioni di molluschi. Il metodo generalmente non richiede alcun step di purificazione del campione.

Il nuovo metodo è stato sviluppato utilizzando uno strumento a trappola ionica operante in modalità FS MS e MS/MS oppure un sistema a triplo-quadrupolo operante in modalità di acquisizione SIM e MRM. Possono essere effettuati esperimenti a ioni positivi o negativi. Gli esperimenti MRM sono raccomandati per lo screening di tessuti di mitili contaminati e per analisi quantitative grazie alla più elevata sensibilità e selettività.

La valutazione dell'effetto matrice ha mostrato che la modalità a ioni positivi subisce l'effetto di soppressione ionica e così gli standard combinati con la matrice devono essere utilizzati per una quantificazione accurata.

L'interferenza della matrice in modalità a ioni negativi sembra essere trascurabile, suggerendo che la quantificazione dell'acido domoico negli estratti grezzi è affidabile anche quando sono utilizzate soluzioni standard a livelli di concentrazione paragonabili. Questi risultati mostrano che la tecnica HILIC/MS è adatta per l'analisi combinata dell'acido domoico e delle PSP tossine in una

singola corsa cromatografica di 35 minuti, utilizzando un gradiente di eluizione. L'eluizione isocratica permette la rivelazione dell'acido domoico in 10 minuti. Inoltre la metodica è utilizzabile per rivelare l'acido domoico in tessuti di mollusco presente in tracce, ben al di sotto del limite previsto dalla legge.

3.1.2 Parte sperimentale

Generale. Tutti i solventi organici impiegati erano di elevata purezza (Carlo Erba, Milano, Italia). L'acqua è stata distillata e filtrata attraverso un sistema di purificazione Milli-Q (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA). L'acido formico a 95-97% e il formiato d'ammonio sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania). Anche uno standard di acido domoico puro (DA) è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich. Sono state preparate 5 soluzioni di DA da utilizzare per la curva di calibrazione operando diluizioni 1-3 con metanolo a partire da una stock solution di acido domoico (10, 3.33, 1.11, 0.37, e 0.123 $\mu\text{g ml}^{-1}$). NRC Certified Reference Materials Program (Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canada) ha fornito soluzioni standard di PSP tossina. Una miscela costituita da DA, goniotoxina1-5 (GTX1-5), neosaxitossina (NEO), saxitossina (STX), allo stesso livello di concentrazioni è stata impiegata per valutare l'applicabilità del metodo HILIC/MS per l'analisi combinata di DA e PSP tossine.

Cromatografia liquida/Spettrometria di massa. Tutte le analisi di massa sono state eseguite su uno spettrometro con sorgente di ionizzazione Turbospray (TSI) a ioni positivi e negativi, e analizzatore a triplo quadrupolo API 2000 Applied Biosystem e uno spettrometro LCQ Classic ion trap con

sorgente ionspray (ISI). Entrambi gli strumenti sono stati connessi ad un sistema HPLC HP modello 1100 (Agilent, USA).

Gli esperimenti LC-MS sono stati eseguiti su colonna 5 μ m TSK-GEL Amide 80 2x250mm (TosoHaas PA, USA). L'eluente A è costituito da H₂O e B da una miscela al 95% CH₃CN/H₂O; entrambi gli eluenti contengono un tampone 2.0mM formiato d'ammonio, 3.6mM acido formico. Un'eluizione isocratica con il 75% B è necessaria per l'analisi dell'acido domoico.

Per l'analisi combinata di acido domoico e PSP tossine è stata utilizzata una eluizione a gradiente (75% B per 5min, 75-65% per 1min fino a 13min, 65-45% B per 4min fino a 10min). il flusso è settato a 200 μ l/min. Sono state effettuate iniezioni di 5 μ l nella maggior parte dei casi.

Gli spettri di massa *full scan* MS sono stati registrati nel range di massa m/z 50-500, utilizzando una temperatura capillare di 150°C, un voltaggio del capillare di 10 V (-45 V in modalità negativa), un voltaggio spray di 4.5KV; e rispettivamente un flusso sheath gas e auxiliary gas di 80 e 20 (unità arbitrarie).

Le total microscans sono state settate a 3, e il maximum injection time a 200ms. Gli extracted ion chromatograms sono stati ottenuti selezionando gli ioni [M-H]⁻ a m/z 310 e gli ioni [M+H]⁺ a m/z 312 rispettivamente in modalità a ioni negativi e positivi.

Successivi esperimenti MS/MS sono stati condotti usando energie di collisione (CE) del 30% e come ioni precursori gli ioni [M+H]⁺ e [M-H]⁻.

Nel caso dello spettrometro di massa API 2000, l'acquisizione è stata condotta in modalità *Selected Ion Monitoring* (SIM) e *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). In questi esperimenti la temperatura del turbogas è stata settata a 350°C, un ionspray voltage a 4500 V (-5000 V in modalità negativa),

un declustering potential (DP) a 86 V (-20 V in modalità negativa), un focusing potential (FP) a 381 V (-394 V in modalità negativa), ed un entrance potential (EP) a 10V (-6 V in modalità negativa).

Per esperimenti MRM sono stati usati un CE di 30 eV (25 eV in modalità negativa) e un cell exit potential (CXP) di 8V (-8V in modalità negativa). Lo ione protonato di DA a m/z 312 e lo ione addotto con il Na a m/z 334 sono stati monitorati in esperimenti SIM a ioni positivi (400ms dwell time), mentre lo ione $[M-H]^-$ a m/z 310 è stato monitorato in esperimenti SIM a ioni negativi (1000ms dwell time).

I seguenti gruppi di 6 transizioni (ione padre > ione figlio) a m/z : (312 > 294, 312 > 266, 312 > 248, 312 > 220, 312 > 193, 312 > 175) e (310 > 266, 310 > 248, 310 > 222, 310 > 204, 310 > 160, 310 > 82) sono stati monitorati in esperimenti MRM rispettivamente in modalità a ioni positivi e negativi. E' stato usato un dwell time di 200 ms per ogni transizione. L'acido domoico è stato quantizzato nei campioni di mitili, per confronto diretto con una soluzione di acido domoico standard a concentrazione paragonabile iniettata nelle stesse condizioni sperimentali.

Effetto Matrice. Un campione di tessuto di molluschi non contaminati (10g) è stato estratto attraverso l'aggiunta di 40ml di metanolo/acqua (1:1; v/v) ed è stato omogeneizzato per 30 minuti. La miscela è stata centrifugata usando un rotore ad angolo fisso (r_{max} 9.5cm) a 4000 rpm per 30 minuti, i supernatanti sono stati decantati, completamente evaporati e ridisciolti in 10ml di metanolo/acqua (1:1; v/v) per ottenere un estratto grezzo con concentrazione di $1g\ ml^{-1}$.

Un'aliquota di 1ml di estratto grezzo è stata contaminata con 20 μ g di acido domoico standard e analizzata in triplicato in confronto ad una soluzione di standard puro di acido domoico (20 μ g ml⁻¹), per valutare gli effetti di soppressione o di potenziamento dovuti alla matrice.

Sono state preparate quindi sei diluizioni dall'estratto contaminato di 1g ml⁻¹ (0.5; 0.25; 0.167; 0.125; 0.0625; 0.03125g ml⁻¹) e sono state analizzate in triplicato in modalità MRM a ioni positivi e ioni negativi.

I valori del rapporto area del picco/Q, sono stati diagrammati rispetto a Q, dove Q è la quantità di tessuto equivalente iniettato. Sono stati dunque selezionati i livelli di diluizione di matrice ottimali che permettono di minimizzare l'effetto matrice: 0.125 g ml⁻¹ e 0.0625 g ml⁻¹ rispettivamente per gli esperimenti di MRM a ioni negativi e positivi.

Successivamente sono state preparate soluzioni di acido domoico standard sia puro che combinato con la matrice a quattro livelli di concentrazione (20; 10; 2; 0.2 μ g ml⁻¹) utilizzando rispettivamente solvente puro ed estratti metanolo/acqua (1:1; v/v) di mitili non contaminati contenenti un livello di matrice pari a 0.125 e 0.0625g ml⁻¹. Gli standard sono stati analizzati sia in modalità MRM a ioni negativi che positivi per generare curve di calibrazione di DA puro e in matrice.

3.1.3 Riferimenti bibliografici

1. Quilliam, M.A.; Wright J.L.C., *Anal. Chem.* **1989**, p.1053.
2. Berman, F.W; Murray, T.F., *J. Neurochem.* **1997**, 69, p. 693.

3. Bates, S.S.; Bird, C.J.; De Freitas, A.S.W.; Foxall, R.; Gilgan, M.; Hanic, L.A.; Johnson, G.R.; McCulloch, A.W.; Odense, P.; et al.. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* **1989**, *46*, p.1203.
4. Garrison D.L., Conrad S.M., Eilers P.P., Waldron E.M. *J. Phycol.* **1992**, *28*, p. 604.
5. Martin J.L., Haya K., Burrige L.E., Wildish D.J. *Marine Ecol.: Progress Series* **1990**, *67*, p. 177.
6. Cerino F., Orsini L., Sarno D., dell'Aversano C., Tartaglione L., Zingone A. *Harmful Algae* **2005**, *4*, p. 33.
7. Quilliam M.A. In *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (eds). IOC/UNESCO: Paris, **2003**; p. 247.
8. Lawrence J.F., Charbonneau C.F., Menard C., Quilliam M.A., Sim P.G. *J. Chromatogr.* **1989**, *462*, p. 349.
9. Tasker R.A.R., Connell B.J., Strain S.M.. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1991**, *69*, p. 378.
10. Nijjar M.S., Nijjar S.S. In *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, Botana LM (ed). Marcel Dekker inc.: New York, **2000**, p. 325.
11. Quilliam M.A., Sim P.G., McCulloch A.W., McInnes A.G. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1989**, *36*, p. 139.
12. Quilliam M.A., Xie M., Hardstaff W.R.. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, p. 543.
13. Nguyen A.L., Luong J.H.T., Masson C. *Anal. Letters* **1990**, *23*, p. 1621.
14. Zhao J.Y., Thibault P., Quilliam M.A.. *Electrophoresis* **1997**, *18*, p. 268.
15. Pocklington R., Milley J.E., Bates S.S., Bird C.J., De Freitas A.S.W., Quilliam M.A.. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1990**, *38*, p. 351.

16. Quilliam M.A.. *J. Chromatogr. A*. **2003**, 1000, p. 527.
17. Quilliam M.A., Thomson B.A., Scott G.J., Siu K.W.M.. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, 3, p. 145.
18. Lawrence J.F., Lau B.P.Y., Cleroux C., Lewis D. *J. Chromatogr.* **1994**, 659, p. 119.
19. Hummert C., Ruhl A., Reinhardt K., Gerdt G., Luckas B. *Chromatographia* **2002**, 55, p. 673.
20. Hess P., Gallacher S., Bates L.A., Brown N., Quilliam M.A. *Journal of AOAC Inter.* **2001** Sep-Oct; 84, p. 1657.
21. Quilliam M.A., Hess P., Dell'Aversano C. In *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium*, deKoe WJ, Samson RA, Van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M (eds), W.J. deKoe, Wageningen, The Netherlands, **2001**, p. 383.
22. Furey A., Lehane M., Gillman M., Fernandez-Puente P., James K.J. *J. Chromatog. A*. **2001**, 938, p. 167.
23. Dell'Aversano C., Eaglesham G.K., Quilliam M.A.. *J. Chromatogr. A*. **2004**, 155, p. 1028.
24. Dell'Aversano C., Hess P., Quilliam M.A., *J. Chromatogr. A* **2005**; in press.
25. Alpert A.J. *J. Chromatogr.* **1990**, 499, p. 177.
26. Strege M.A.. *Anal. Chem.* **1998**, 70, p. 2439.

3.2 Determinazione HILIC-MS di acido domoico in mitili dell'Adriatico

Allo scopo di valutare l'applicabilità del metodo HILIC-MS sviluppato per la rivelazione dell'acido domoico, per l'analisi dei mitili, sono stati presi in esame una serie di campioni di *Mytilus galloprovincialis* raccolti lungo le coste del mar Adriatico nel periodo compreso tra il 2000-2004, in concomitanza di fioriture massive di diatomee del genere *Pseudonitzschia*, nei pressi dei siti di raccolta. Si ritiene infatti che il principale produttore di acido domoico sia la diatomea ampiamente distribuita nelle acque costiere di tutto il mondo *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriata*^{1,2}, insieme ad altre specie, quali la *Pseudonitzschia australis*, *P. pseudo-delicatissima*, etc..

3.2.1 Risultati

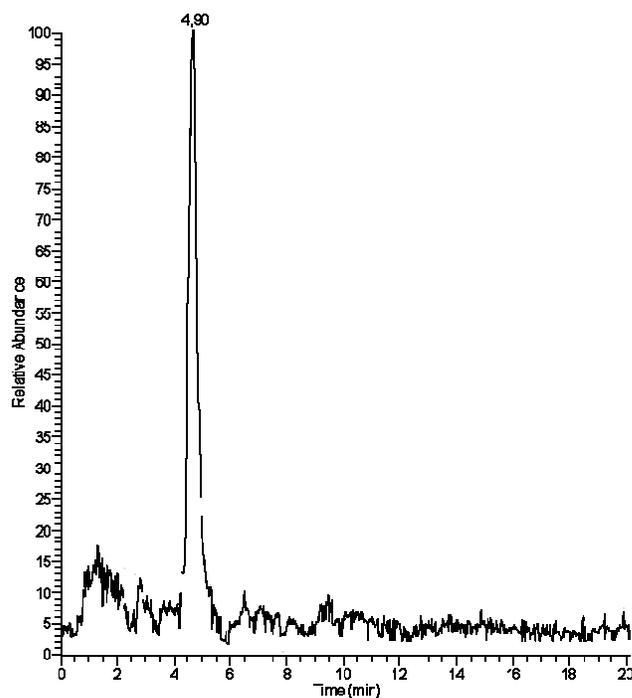
I mitili privati delle valve sono stati sottoposti ad omogeneizzazione. Due aliquote del tessuto omogeneizzato sono state prelevate e sottoposte separatamente a due procedimenti di estrazione:

1. utilizzando una miscela di MeOH/H₂O (1: 1 v/v)
2. utilizzando una soluzione acquosa 0.1 M di acido acetico

Entrambe le procedure consentono la coestrazione delle tossine idrosolubili PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) ed ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*), quando esse sono copresenti. Successivamente gli estratti grezzi ottenuti sono stati direttamente analizzati attraverso il metodo HILIC-MS messo a punto per le tossine idrosolubili.

Le analisi qualitative HILIC-MS preliminari sono state condotte su di uno spettrometro ISI-ion trap in modalità a ioni positivi, operando in *full scan MS* a

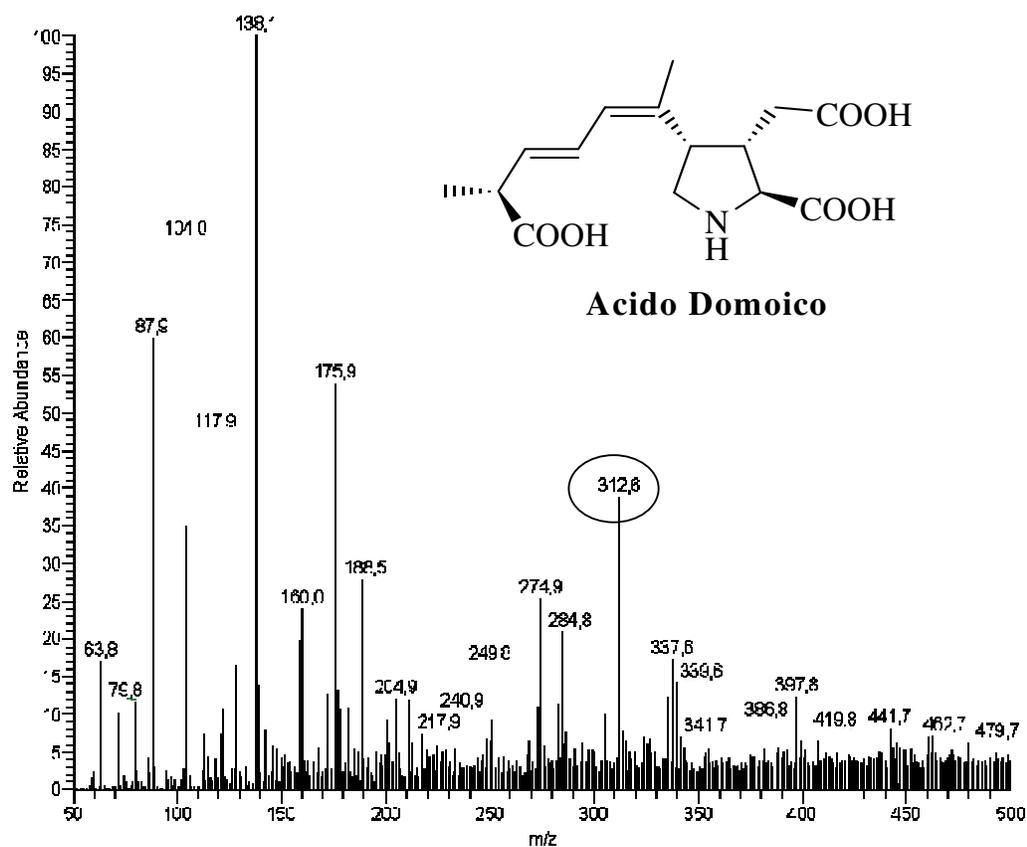
ioni positivi nel range di m/z 150-500, sfruttando l'elevata sensibilità che un analizzatore a trappola ionica riesce ad offrire in questa modalità di acquisizione. Il problema della selettività è stato superato estraendo, in fase di processing dei dati, dal *Total Ion Chromatogram* (TIC) gli ioni di interesse che vengono così rivelati sotto forma di *Extracted Ion Chromatograms* (XIC). Gli XIC relativi ad una serie di PSP tossine note, non presentavano alcun picco, ovvero escludevano la presenza di PSP tossine all'interno dei campioni analizzati. Invece lo XIC dello ione a m/z 312, corrispondente allo ione protonato dell'acido domico mostrava, per alcuni degli estratti analizzati, la presenza di un picco cromatografico che eluiva a tempo di ritenzione di 4,90 min.



Extracted Ion Chromatogram dello ione $[M+H]^+$ a m/z 312 corrispondente a DA contenuto in un estratto di mitili provenienti dal Golfo di Trieste, raccolti nel 2002.

Eluizione isocratica riportata nella parte sperimentale.

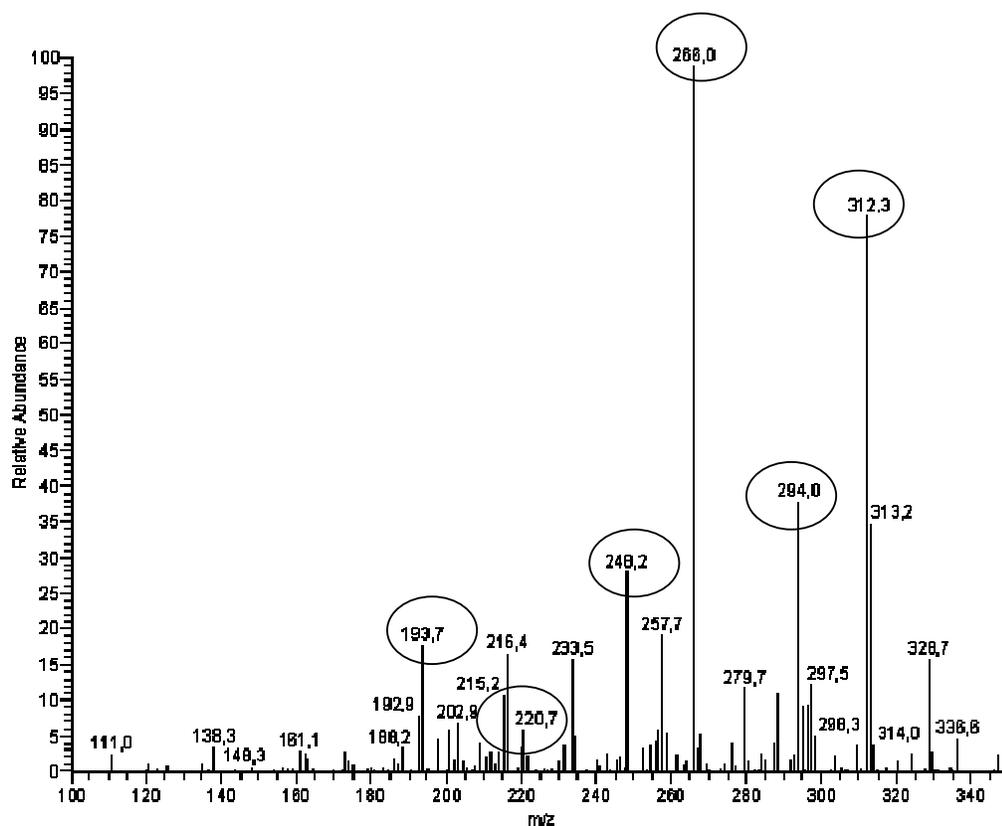
Il tempo di ritenzione e lo spettro di massa corrispondente a questo picco risultavano perfettamente coincidenti con quelli di un campione standard di DA, iniettato nelle stesse condizioni sperimentali.



Spettro full scan MS di un estratto di mitili provenienti dal Golfo di Trieste, raccolti nel 2002 in cui è presente lo ione $[M+H]^+$ a m/z 312 corrispondente a DA.

Un'ulteriore conferma della presenza di DA nei campioni analizzati è stata ottenuta tramite esperimenti di MS/MS a ioni positivi, effettuati selezionando lo ione a m/z 312 come ione precursore impiegando un'energia di collisione pari al 30%.

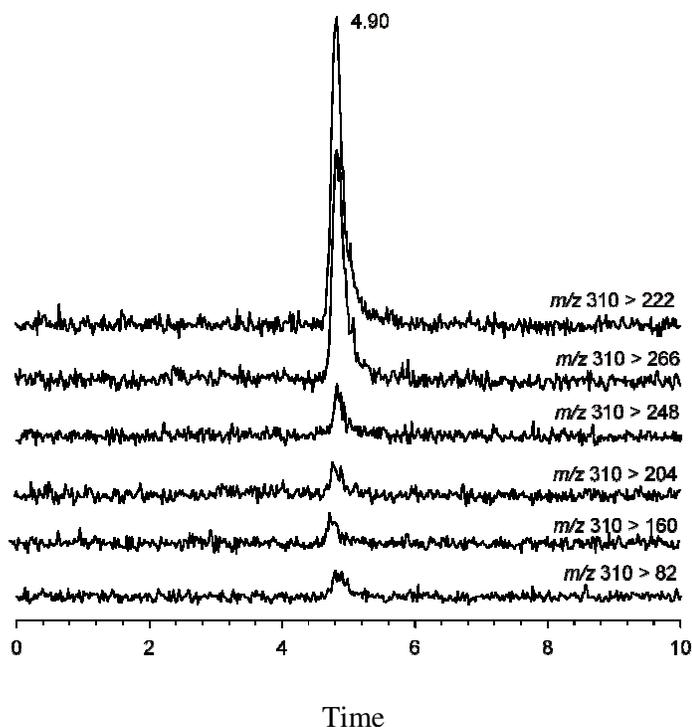
Il pattern di frammentazione osservato era in accordo con quello riportato in letteratura per l'acido domoico standard, sia per identità dei frammenti che per abbondanze relative degli ioni frammento ottenuti.



Spettro di MS/MS dello ione $[M+H]^+$ a m/z 312 in un estratto di mitili provenienti dal Golfo di Trieste, raccolti nel 2002.

La conferma definitiva, ma soprattutto la quantificazione dell'acido domoico presente nei campioni analizzati, è stata effettuata su di uno spettrometro TSI-triple-quadrupole. Questo tipo di strumento è in genere preferito per analisi quantitative accurate rispetto agli strumenti a trappola ionica nei quali il tempo di scansione relativamente basso, rende complesso l'ottenimento di dati quantitativi affidabili. Sono stati dunque registrati per tutti gli estratti di mitili, esperimenti di tipo SIM ed MRM in entrambe le modalità di

acquisizione. Sfortunatamente, gli esperimenti SIM presentavano oltre ad un elevato rumore di fondo, la complicità di numerosi extra-picchi dovuti a contaminanti presenti nell'estratto grezzo che rendevano complessa ed ambigua l'interpretazione dei dati. Tutti questi inconvenienti sono stati superati attraverso l'esecuzione di esperimenti MRM che, grazie alla maggiore selettività e sensibilità (in termini di rapporto segnale/rumore S/N), hanno consentito la conferma definitiva dell'identità della tossina nei campioni analizzati. Le transizioni ione precursore > ione prodotto da monitorare negli esperimenti MRM sono state selezionate sulla base del pattern di frammentazione osservato per l'acido domoico standard. A titolo di esempio, è mostrata l'analisi MRM a ioni negativi per uno dei campioni analizzati. Come si può notare oltre al tempo di ritenzione (4.90 min.) e alla presenza delle sei transizioni diagnostiche per DA, le abbondanze relative confermavano inconfutabilmente i risultati ottenuti con l'analizzatore a trappola ovvero l'acido domoico era realmente un contaminante dei mitili italiani.



Analisi HILIC-MS in modalità MRM a ioni negativi di un estratto di molluschi raccolti nel golfo di Trieste nel 2002

Ai fini di un'analisi quantitativa, sono stati utilizzati i dati registrati per gli estratti MeOH/H₂O (1:1 v/v) (procedura ufficiale di estrazione AOAC) considerando le transizioni più abbondanti (m/z 310 > 266 e m/z 310 > 222) negli esperimenti in modalità a ioni negativi. Risultati analoghi possono comunque essere ottenuti utilizzando la procedura di estrazione che impiega una miscela acetonitrile/acqua (8:2, v/v) addizionata dello 0.1% di acido formico. Invece l'estrazione di DA con acido acetico 0.1 M sembra non garantire stabilità dell'estratto per lunghi periodi. Il quantitativo di DA presente nei campioni di *M. galloprovincialis* è stato determinato per comparazione diretta con una soluzione standard di acido domoico puro a concentrazione paragonabile iniettato nelle stesse condizioni sperimentali. Le concentrazioni ($\mu\text{g/g}$) di DA

nei campioni di mitili del mar Adriatico raccolti nel periodo 2000-2004 sono state:

| Sito di raccolta | Data di raccolta | DA ($\mu\text{g/g}$) |
|-------------------------|-------------------------|--|
| Cesenatico | 12/2000 | 2.5 |
| Cesenatico | 03/2000 | 2.0 |
| Trieste | 05/2002 | 0.25 |
| Lido Spina | 05/2002 | 0.70 |
| Ravenna | 04/2003 | n.d. |
| Cervia | 05/2003 | n.d. |
| Cervia-Rimini | 07/2003 | n.d. |
| Ravenna | 08/2003 | n.d. |
| Bellaria | 10/2003 | n.d. |
| Cattolica | 10/2003 | n.d. |
| Panzano | 06/2004 | n.d. |

n.d. = not detected.

Conclusioni

Il metodo HILIC-MS sviluppato, permette la rapida e chiara identificazione e quantizzazione di acido domoico, in campioni di molluschi anche in tracce ben al di sotto dei limiti regolatori previsti dalla legge.

L'applicazione del metodo ai mitili dell'Adriatico ha evidenziato, per la prima volta, la presenza dell'acido domoico come nuova tossina che complica ulteriormente il profilo tossico dei mitili italiani dell'Adriatico. Sebbene le concentrazioni di DA nei campioni analizzati siano ben al di sotto del corrente livello previsto dalla legge, si è reso necessario un attento monitoraggio di questa tossina nei *Mytilus galloprovincialis* italiani.

3.2.2 Parte sperimentale

Generale. Tutti gli esperimenti LC-MS e LC-MS/MS sono stati realizzati su spettrometro di massa a trappola ionica Thermo-Electron LCQ Classic (San Jose, CA, USA) con sorgente a ionizzazione Ionospray (ISI) o su spettrometro di massa a triplo quadrupolo PE SCIEX API 2000 (Applied Biosystems, Concord, ON, Canada) con sorgente a ionizzazione Turbospray (TSI). Entrambi gli strumenti sono stati accoppiati ad un sistema HPLC HP1100 (Agilent, USA). È stata usata una colonna 5 µm TSK gel Amide 80 2 x 250 mm (TosoHaas PA, USA), negli esperimenti analitici. L'eluizione isocratica delle colonne è stata effettuata con il 75% B, dove A= 100% H₂O 2.0mM HCOO⁻NH₄⁺/3.6 mM HCOOH e B= 95% ACN 2.0mM HCOO⁻NH₄⁺/3.6 mM HCOOH. Il flusso usato è di 200 µl/min ed è stato utilizzato uno split post-colonna per far arrivare in sorgente un flusso di circa 50 µl/min. Sono state effettuate iniezioni da 5 µl nella maggior parte dei casi. Gli esperimenti *Full scan* MS, SIM ed MRM sono stati effettuati utilizzando le medesime condizioni sperimentali riportate nel sottocapitolo 3.1.

Estrazione di *M. galloprovincialis*. I campioni di mitili provenienti dal mar Adriatico sono stati raccolti nelle aree costiere dell'Emilia Romagna nel periodo dal 200-2003, e nel golfo di Trieste nel Maggio 2002 e giugno 2004. In seguito alla raccolta, i mitili sono stati congelati a -20°C e così conservati fino al momento dell'estrazione. Come campione rappresentativo, un'aliquota di 140g di tessuto di mitili prelevati dai molluschi bivalvi, è stata omogeneizzata in un frullatore Waring. Da questo omogenato sono stati prelevati 3 subcampioni sottoposti a tre diverse procedure estrattive. 20g di tessuto sono stati estratti con

100 ml di una soluzione CH₃CN/H₂O (8:2, v/v) addizionati dello 0.1% di acido formico e tenuti in agitazione per 5 ore. La miscela è stata centrifugata utilizzando un rotore ad angolo fisso (r_{\max} 9.5 cm) alla velocità di 4000 rpm per 20 minuti, il surnatante è stato decantato e una parte di esso (20 ml) è stato estratto per due volte con 20 ml di *n*-esano. La fase *n*-esamica è stata scartata e la fase acetonitrile/H₂O è stata addizionata di 4 ml di H₂O e 24 ml di diclorometano. Il tutto è stato dibattuto per 10 minuti in imbuto ripartitore. La fase diclorometanica è stata trasferita in una beuta e la fase acquosa è stata nuovamente estratta con 24 ml di diclorometano. La fase acquosa è stata evaporata sottovuoto. Il residuo ottenuto è stato disciolto in 4 ml di una soluzione MeOH/H₂O (1:1, v/v) in modo da ottenere una soluzione contenente un grammo di tessuto di mitili per ml, da analizzare direttamente via HILIC-MS.

Due ulteriori aliquote di tessuto di mitili di 4 g ciascuna, sono state sottoposte ad ulteriori procedure di estrazione: la prima ha previsto l'aggiunta di 16 ml di MeOH/H₂O (1:1, v/v), l'altra di 16 ml di una soluzione acquosa 0.1 M di acido acetico. Le miscele, sono state omogeneizzate con omogeneizzatore Heidolph Diax-900 per trenta minuti con l'ausilio di un bagnetto di ghiaccio. Le miscele così ottenute sono state centrifugate utilizzando un rotore ad angolo fisso (r_{\max} 9.5 cm) alla velocità di 4000 rpm per 20 minuti e i surnatanti sono stati decantati, evaporati e ridisciolti ciascuno in 4 ml di una soluzione MeOH/H₂O (1:1, v/v). Sugli estratti grezzi così ottenuti sono state effettuate analisi HILIC-MS.

3.2.3 Riferimenti bibliografici

1. Garrison, D.L.; Conrad, S.M.; Eilers, P.P.; Waldron, E.M.; *J. Phycol.* **1992**, 28, p. 604.
2. Martin, J.L.; Haya, K.; Burrige, L.E.; Wildish, D.J.; *Marine Ecol.: Progress Series* **1990**, 67, p.177.

3.3 Rivelazione HILIC-MS della tossicità della nuova specie di diatomea del Golfo di Napoli: la *Pseudo-nitzschia galaxiae*

Il genere *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo include circa 25 specie di diatomee pennate coloniali marine. Il genere fu originariamente considerato come un ramo della *Nitzschia* A. H. Hassall,¹ dalla quale fu successivamente separato sulla base dell'habitat coloniale e di alcune caratteristiche ultrastrutturali.² In anni recenti, le indagini morfologiche e molecolari sulla *Pseudo-nitzschia* si sono intensificate in seguito alla scoperta dell'acido domoico,³ che può essere accumulato tramite tessuto trofico, divenendo causa di nocività per uomini, mammiferi marini ed uccelli. Nove specie di *Pseudo-nitzschia* sono comunemente note come produttrici di acido domoico. Studi riguardanti la distribuzione geografica del genere *Pseudo-nitzschia* mostrano una distribuzione in tutto il mondo e tale genere include specie cosmopolite, temperate e tropicali. Analisi filogenetiche condotte su 2 differenti sequenze di set parziali di dati all'LSU rDNA,^{4,5,6} hanno mostrato che il genere *Pseudo-nitzschia* è parafiletico,⁵ con relazioni filogenetiche ben determinate a livello di specie ma non ad un livello superiore.

Nel Golfo di Napoli, la specie *Pseudo-nitzschia* è stata riportata come “*Nitzschia* formante colonie” sin dalla prima osservazione del fitoplancton nell'area.^{7,8} Più recentemente, sono state identificate sette specie differenti di *Pseudo-nitzschia* nel corso di 15 anni del programma di campionamento lungo le zone costiere circostanti la città di Napoli.^{9,10} Tra queste, morfotipi molto sottili con un piccolo rigonfiamento centrale sono stati attribuiti alla *P. prolongatoides* (Hasle) Hasle. Nel Maggio del 2001, esemplari con questa forma lanceolata sono stati messi in coltura e hanno mostrato caratteristiche

ultrastrutturali che erano chiaramente distinte dalla *P. prolongatoides* e da ogni altra specie di *Pseudo-nitzschia*, rendendo così necessarie delle analisi molecolari tese a chiarire le relazioni filogenetiche. Nello stesso tempo, morfotipi simili alla *P. prolongatoides* provenienti dal Golfo di Napoli sono stati definiti come una nuova specie sotto il nome di *P. galaxiae*⁵. La *P. galaxiae* presenta un contorno delle valve leggermente rigonfio al centro della cellula e assottigliato verso le estremità. L'ultrastruttura valvare è chiaramente caratteristica della specie, a causa della mancanza di poroidi che sono tipici delle altre specie di *Pseudo-nitzschia* e della presenza di minuscoli pori su tutto il frustulo.

E' stata effettuata l'analisi di un ampio range di variabilità di forma e dimensioni di *Pseudo-nitzschia galaxiae* in coltura e retinate, prelevata dal Mar Mediterraneo, in paragone alla descrizione originaria. L'identità della specie, e la sua sostanziale omogeneità genetica, è stata confermata da analisi LSU. Il ruolo del ciclo vitale nell'incidenza stagionale delle specie del Golfo di Napoli è discusso basandosi sulla successione delle differenti dimensioni durante l'anno. Tale analisi è stata svolta presso la Stazione Zoologica "A. Dohrn" di Napoli.

La tossicità della *P. galaxiae* è stata valutata indagando per ciascun campione il contenuto di acido domoico mediante HILIC-MS presso i nostri laboratori del Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali.

3.3.1 Risultati

Morfologia. Presso i laboratori della Stazione Zoologica di Napoli, sono state condotte indagini morfologiche sulle cellule di *Pseudo-nitzschia galaxiae* provenienti dal Golfo di Napoli.

Tali cellule sono sottili e debolmente silicizzate, l'asse apicale è lungo 10-82 μm (in media 1.2 ± 17.70 SD, n 551), l'asse transapicale è lungo 1-1.8 μm (in media 1.2 ± 0.3 , n 37). Dal punto di vista delle valve, le cellule sono lanceolate a forma d'ago, con un rigonfiamento nella loro parte centrale. Nell'area centrale si trovano 2 cloroplasti .

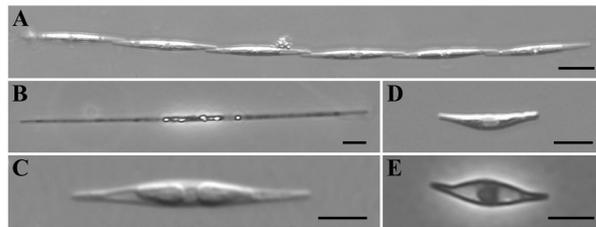


Immagine al microscopio elettronico della P. galaxiae del Golfo di Napoli

Guardandole dalla cintura, le cellule hanno un profilo lineare e una sovrapposizione circa del 5-10% quando formano colonie a strati. La rafe eccentrica è caratterizzata dalla presenza di una larga fessura centrale

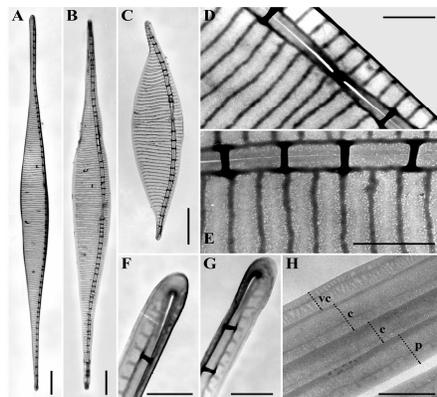
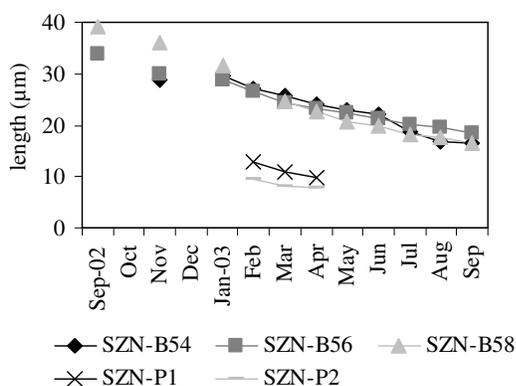


Immagine al microscopio elettronico di cellule di P. galaxiae in coltura

Le valve mostrano 18-28 peroni e 54-68 strie in 10 μm . Le strie non hanno poroidi e sono perforate da piccoli pori dispersi, che sono in numero variabile e generalmente più densi nelle aree chiuse tra le interstrie. I mantelli prossimale e distale hanno la stessa struttura della superficie delle valve. Le valve si assottigliano distalmente, e finiscono con rostri molto sottili (0.2-0.6 μm); le punte opposte della stessa valva mostrano una struttura simile. La cintura comprende 3 tipi di bande aperte, tutte con piccole perforazioni diffuse e una nervatura silicizzata che percorre tutta la loro lunghezza. La prima banda della cintura, la valvocopula, ha un motivo di strie simile alla valva su uno o su entrambi i lati della nervatura. Le copule (1 o 2) sono omogeneamente silicizzate su entrambi i lati della nervatura; la pleura mostra un motivo molto irregolare di strisce non silicizzate separate da strisce silicizzate ramificate.

Oltre al tipico morfotipo, conforme alla descrizione originale e al range di grandezza della specie (25-41 μm), sono stati osservati, nel materiale proveniente dal Mar Mediterraneo, morfotipi più lunghi (più di 82 μm) e più corti (meno di 10 μm). Le differenze nella lunghezza delle cellule sono dovute all'estensione variabile dei rostri, che danno come risultato diverse forme cellulari. Mentre gli esemplari di taglia media sono di forma lanceolata, con estremità chiaramente rostrate, gli esemplari più grandi tendono a perdere i contorni lanceolati, poiché hanno valve con margini quasi paralleli. Negli esemplari piccoli, i rostri diventano più corti, e in quelli ancora più piccoli l'intera cellula assume un contorno ovale, con un graduale o repentino assottigliamento delle estremità. I limiti tra la lunghezza dei diversi morfotipi sono approssimativamente di 20-25 μm per il passaggio dal morfotipo piccolo al medio, e 40-45 μm per il passaggio dal medio al lungo. Tutti i diversi

morfotipi mostrano identiche caratteristiche ultrastrutturali. I ceppi messi in coltura, provenienti dal Golfo di Napoli, appartenevano ai morfotipi di taglia media (ceppi SZN-B54, SZN-B55, SZN-B56, SZN-B57, SZN-B58) e piccola (SZN-P1, SZN-P5). Mentre i morfotipi di taglia media formavano colonie stratificate di più di 14 esemplari nelle placche di coltura, quelli piccoli sono stati osservati come cellule singole o, raramente, in coppia. Le colture di *P. galaxiae* hanno mostrato, col passare del tempo, una diminuzione costante nella taglia media delle cellule.



Medie mensili della riduzione di taglia in P. galaxiae

Il decremento della taglia cellulare era compreso tra 0.5 e 2.4 µm al mese per i cloni più grandi, e 0.3-2.0 µm al mese per quelli più piccoli.

Questi esemplari di *Pseudo-nitzschia galaxiae* del Mar Mediterraneo, in accordo alla descrizione originale,⁵ hanno esattamente le stesse caratteristiche ultrastrutturali, come il numero di peroni e strie e la presenza di una sottile perforazione sulla valva e sulle bande. Comunque, la *P. galaxiae* mediterranea mostrava un range molto ampio di variabilità di dimensioni e di forma. Un cambiamento nella forma dovuto all'accorciamento delle estremità rostrate era già stato notato in cellule con un range di taglia di 24-41 µm.⁵ Nel materiale

proveniente dal Mediterraneo, il cambiamento di dimensione era così estremo che gli esemplari più piccoli (10-25 μm) potevano essere difficilmente identificati come *Pseudo-nitzschia*.

La variabilità morfologica osservata era strettamente correlata alla riduzione di taglia, che nelle diatomee è associata con la divisione delle cellule vegetative. Variazioni nella forma, con riduzioni di taglia, non sono insolite nelle diatomee pennate, dove l'asse transapicale decresce proporzionalmente molto più di quello apicale. Questo fenomeno è più evidente in cellule con estremità rostrate,¹¹ e ciò potrebbe spiegare perché il fenomeno è molto più marcato nella *P. galaxiae* rispetto alle altre specie di *Pseudo-nitzschia* con contorno lineare delle valve. Tra le diatomee centriche, la Cymatosiraceae bipolare rappresenta uno dei casi più sensazionali di variabilità morfologica, perché la riduzione di taglia determina il cambiamento del contorno delle valve da una forma lanceolata, tipica dei pennati, ad una subcircolare, tipica delle centriche, il che comporta sia una riduzione dell'asse transapicale che un incremento dell'asse apicale. La variazione nella taglia e nella forma delle valve nelle Cymatosiraceae non permetterebbe di attribuire diversi morfotipi alla stessa specie se essi non fossero stati studiati in coltura.¹² La stessa cosa può essere detta per la *P. galaxiae*, con un'ulteriore complicazione dovuta al fatto che nelle retinate i differenti morfotipi non si manifestano nello stesso momento.

La formazione delle catene non è stata osservata nelle colture degli esemplari più piccoli della *P. galaxiae*. Le estremità delle cellule erano probabilmente troppo corte per permettere una sovrapposizione sufficiente per la formazione di colonie stabili. La variabilità intraspecifica nella formazione

delle colonie ricorreva anche in altre diatomee, e.g. *Cerataulina pelagica* (Cleve) Hendy, *Leptocylindrus danicus* Cleve e *Chaetocerus socialis* Lauder. Nelle Cymatosiraceae, la variabilità nella formazione di colonie non è generalmente correlata alla taglia, ad eccezione della *Minutocellos* Hasle, specie von Stosch & Syvertsen, dove, a differenza della *P. galaxiae*, solo le cellule con l'asse transapicale più piccolo formano colonie.¹³

La *P. galaxiae* rappresenta il caso estremo di variabilità intraspecifica di taglia, forma e formazione di colonie tra tutte le specie di *Pseudo-nitzschia*. Nella *P. delicatissima*, che è un'altra specie abbondante nel Golfo di Napoli, valori di grandezza transapicale comparabili con quelli minimi della *P. galaxiae* possono essere ottenuti in ceppi coltivati (D'Alelio e Montresor, dati non pubblicati). Comunque, esemplari così piccoli di *P. delicatissima* non sono stati mai trovati né nel Golfo di Napoli, né altrove, il che significa che o non possono sopravvivere, o non raggiungono concentrazioni rilevanti nell'ambiente naturale.

Come discusso da Lundholm e Moestrup (2003), la forma sottile e lanceolata della *P. galaxiae* è stata trovata anche in altre specie di *Pseudo-nitzschia*. Nei campioni del Golfo di Napoli, gli esemplari di taglia lunga e media di *P. galaxiae* sono stati convenzionalmente identificati come *P. prolongatoides* sulla base della loro forma. Le specie più recenti, che possono formare colonie stellate oltre alle tipiche colonie a strati¹ non sono mai state ritrovate in alcun luogo oltre che nelle acque dell'Antartico. Anche la *P. granii* Hasle ha una forma lanceolata con un rigonfiamento centrale. In alcuni campioni del Mar Adriatico, sono stati trovati esemplari sottili e delicati di *P. delicatissima* che è stato difficile distinguere dalla *P. galaxiae* di taglia lunga.

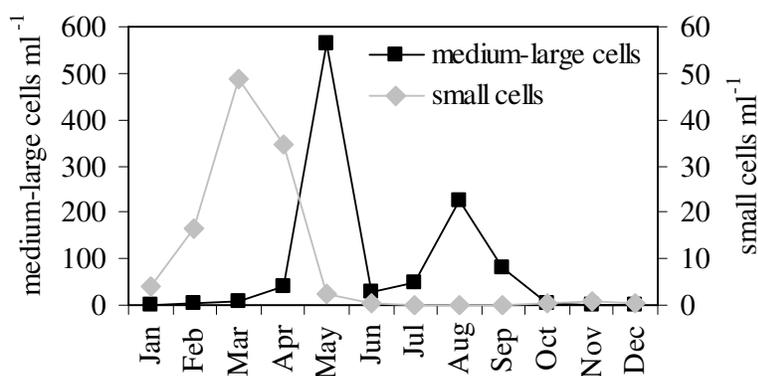
Comunque, in tutte queste specie congeneri, il frustolo ha dei poroidi e non la fine perforazione tipica della *P. galaxiae*. Paragonata con altre *Pseudonitzschia*, anche la *P. galaxiae* è estremamente sottile e delicata, il che è dovuto a silicizzazioni molto deboli. Queste caratteristiche, accoppiate alla tendenza a vivere singolarmente o a formare colonie molto piccole, potrebbero implicare un dispendio più basso per il riscaldamento ed essere un vantaggio nelle acque stratificate come quelle del Golfo di Napoli in tarda primavera-estate.¹⁴

L'ampia variabilità di forma e dimensioni della *P. galaxiae* nelle retinate può essere una causa di mancata identificazione anche a livello di genere. Prima di questa indagine, gli esemplari più piccoli che fiorivano ad inizio primavera nel Golfo di Napoli sono stati identificati in modo incerto come *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin, ed invece i filoni pennati delle specie più recenti sono veramente simili alla piccola *P. galaxiae*, benché essi possiedano un solo cloroplasto. *Phaeodactylum tricorutum* è una delle diatomee ampiamente più usate negli esperimenti di laboratorio, tuttavia la sua distribuzione nell'ambiente naturale non è nota. Nel Mar Mediterraneo la specie è presente in diverse aree, che includono il Mare Catalano,^{15,16} il Golfo di Marsiglia,¹⁷ il Mar Tirreno,¹⁸ il Mar Ionio¹⁹ e la costa Libanese.²⁰ Comunque, la similarità con la *P. galaxiae* pone dubbi sul valore di queste identificazioni, che sono basate su osservazioni al microscopio ottico. D'altra parte, gli esemplari lunghi di *P. galaxiae* non sono facilmente distinguibili da *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Lewin & Reimann, che di tanto in tanto viene rinvenuta con estremità dritte invece delle tipiche estremità ricurve. Le due specie tendono a presentarsi insieme e in concentrazioni comparabili nei campioni estivi del Golfo di Napoli, rendendo la loro classificazione piuttosto complicata. Tutti questi problemi d'identificazione

possono essere la causa della mancanza di precedenti registrazioni di *P. galaxiae*, che al contrario appare piuttosto ampiamente distribuita nel Mar Mediterraneo, basandoci sui nostri dati.

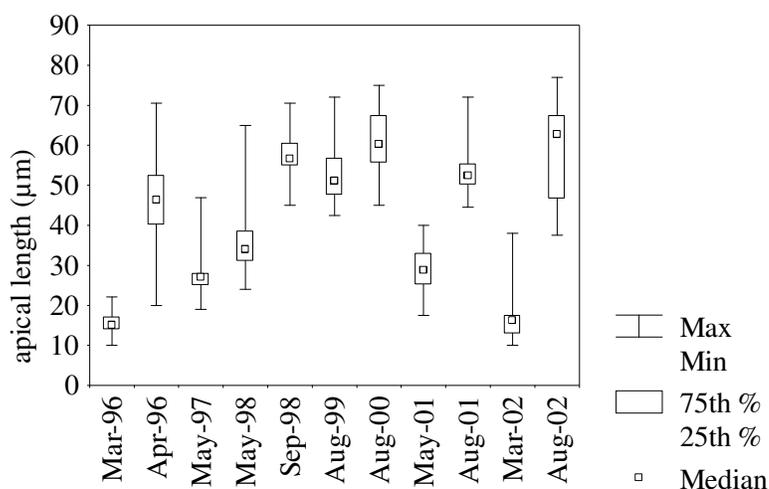
Distribuzione della P. galaxiae

Nel Golfo di Napoli, la presenza della *Pseudo-nitzschia galaxiae* è stata registrata da febbraio a novembre, in corrispondenza con valori di temperatura e salinità di 13.3-28.1 °C e 36.6-38.2 PSU. Un primo incremento annuale era di solito registrato in febbraio-marzo (fino a $7.3 \cdot 10^5$ cellule l^{-1} nel marzo 1996). Il picco annuale di concentrazione (fino a $9.4 \cdot 10^6$ cellule l^{-1} nel maggio 1985) si verificava in genere in maggio e agosto.



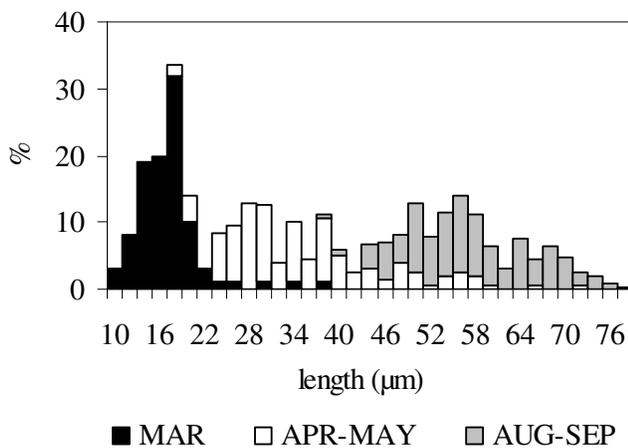
Medie mensili (1984-1991; 1995-2002) delle concentrazioni di cellule di P. galaxiae di taglia medio-lunga e piccola.

Di solito, cellule di classi di diversa taglia non si riscontravano tutte insieme nello stesso campione.



Lunghezza dell'asse apicale di P. galaxiae in retinate del Golfo di Napoli

Il primo incremento annuale a fine inverno-inizio primavera era prevalentemente dovuto ai morfotipi più piccoli, con registrazioni più rare di quelli di taglia media.



Distribuzione percentuale della lunghezza di P. galaxiae del Golfo di Napoli durante le 3 fasi di picco.

Nelle fioriture di fine primavera dominavano i morfotipi di taglia media, dato che in agosto-settembre molti esemplari erano lunghi più di 50 µm. Il morfotipo piccolo si presentava sempre come cellule singole, mentre i morfotipi

medio e lungo talvolta mostravano colonie, sebbene la crescita solitaria prevaleva in tutte le taglie.

La *P. galaxiae* è apparentemente molto diffusa nelle acque sia aperte che costiere del Mar Mediterraneo. Oltre al Golfo di Napoli, la specie è stata ritrovata nel Canale aperto di Sicilia, nel porto di Olbia (nord-ovest del Mar Tirreno), al largo delle Isole Baleari, e nel Mar Adriatico.

L' identificazione in tutte queste zone è stata confermata al microscopio elettronico. Un esemplare lungo 14 μm è stato documentato in un'immagine al microscopio elettronico (EM) di un campione proveniente dal Canale di Sicilia (novembre 1991). Gli altri campioni erano relativamente omogenei in termini di taglia e habitat coloniale. Nel materiale del Mare Nord-Balearico (marzo 2003) sono stati riscontrati piccoli esemplari solitari (da 10 a 20 μm) in campioni fissati e colture diluite.

Il materiale del Mar Adriatico (maggio 2002) consisteva prevalentemente di esemplari coloniali con un range di taglia superiore, mentre i campioni di Olbia erano principalmente esemplari coloniali di taglia media.

Distribuzione stagionale di taglia

La taglia media cellulare stagionale nelle diatomee in genere decresce ad ogni divisione cellulare durante la fase di crescita vegetativa. Quando si raggiunge una taglia minima critica, sono ripristinate le massime dimensioni cellulari tramite auxosporulazione.^{21,11} La formazione di auxospore è raramente osservata in situ,³³ perciò le variazioni di taglia nel tempo sono spesso l'unico indizio della riproduzione sessuata.²² Le informazioni sul ciclo vitale della diatomea nell'ambiente naturale sono veramente scarse, essendo soprattutto

limitate a poche specie pennate o centriche²³ provenienti da stagni o piccoli laghi. Queste indagini hanno mostrato che, all'interno di una popolazione, la riproduzione sessuata è un evento strettamente sincronizzato che si verifica in un ristretto range di taglia, con una periodicità che oscilla tra i 2 e i 40 anni.²¹ Sono perciò richiesti campionamenti frequenti ed un numero enorme di misurazioni di taglia per parecchi anni allo scopo di analizzare la riproduzione sessuata. Comunque, il tenere sotto controllo le variazioni di taglia è un compito particolarmente complesso nel caso delle specie planctoniche, a causa della sovrapposizione spaziale e temporale di diversi gruppi nell'ambiente naturale.²¹

La peculiare distribuzione stagionale di taglia ricorrentemente osservata per la *Pseudo-nitzschia galaxiae* pone le basi per alcune ipotesi sul ciclo vitale di questa specie nel Golfo di Napoli. Il picco di inizio primavera dei morfotipi di *P. galaxiae* che raggiungono la minima taglia cellulare è particolarmente interessante. Si ritiene che queste popolazioni, che sono presumibilmente le più vecchie, si riproducano sessualmente per ripristinare la taglia massima.

Comunque, nessuna cellula di taglia grande, che potrebbe essere il prodotto di una riproduzione sessuata, è stata osservata insieme alle cellule di taglia piccola durante l'inizio della primavera. Ciò potrebbe significare che la riproduzione sessuata si verifica con un ritmo estremamente basso in questa stagione, probabilmente perché le cellule sono troppo piccole, essendo la maggior parte di loro pari al 12-24 % della massima taglia conosciuta. Nella *P. multiseriis*, il limite più basso dell'intervallo di taglia riproduttiva è pari al 23 % della taglia massima.²⁴ Se non si verifica la riproduzione sessuata, le cellule potrebbero crescere in modo vegetativo fino alla morte, come osservato in coltura. Alternativamente, la riproduzione sessuata potrebbe

verificarsi in qualche altro luogo, e.g. in strati d'acqua più profondi e leggeri, ma ciò sembra meno probabile, perché la colonna d'acqua nell'area campionata è perfettamente miscelata in inverno-inizio primavera.

Un'altra ipotesi potrebbe essere che la riproduzione sessuata si verifica entro un ampio range di taglia e non sempre ripristina la massima taglia della specie. Questo si verifica in altre specie pennate, per i quali è stata dimostrata una correlazione tra la taglia delle cellule madre e quella delle auxospore e delle cellule figlie.²⁵ Poche cellule di taglia grande di *P. galaxiae* sono state osservate ad inizio primavera, e forse questa fioritura in maggio potrebbe derivare dalle popolazioni di taglia piccola della prima parte della primavera. Alternativamente, i morfotipi di taglia media che dominano le fioriture di fine primavera potrebbero subire riproduzione sessuata e originare le cellule di taglia grande che fioriscono ad agosto-settembre. Poiché il limite superiore dell'intervallo di taglia riproduttiva è stato scoperto essere molto più alto di quello ipotizzato in precedenza, superiore al 70 % della taglia massima in *P. multiseriis*,²⁴ la riproduzione sessuata potrebbe avvenire anche in *P. galaxiae* in un range più ampio. Le relazioni tra le popolazioni di *P. galaxiae* di un anno con quelle dell'anno successivo sono poco chiare. Basandosi su una diminuzione media di taglia di 2 μm /mese, potrebbero occorrere parecchi anni alla popolazione di massima taglia (70-80 μm) di fine estate, per raggiungere la taglia di inizio primavera di 10-15 μm . Questa velocità di diminuzione di taglia è stata osservata ad una velocità di crescita di ca. 0.9 divisioni/giorno (A. Amato e M. Montresor, dati non pubblicati), che è stata ottenuta con un'intensità luminosa moderata e un fotoperiodo di 12:12. Comunque, la velocità di crescita e di riduzione di taglia potrebbero, nell'ambiente naturale, variare durante

l'anno, ma in ogni caso la popolazione di cellule di taglia piccola ha presumibilmente almeno 2 anni. Questi valori della velocità di riduzione di taglia e della massima età sono comparabili con quelli di ca. 3 anni calcolati per esempio nella *P. multiseriis*.²⁶

Tutte queste ipotesi necessitano di essere supportate con valide informazioni sulla riproduzione sessuata, sugli intervalli di taglia riproduttiva, sulla massima taglia cellulare ottenuta, sulla velocità di riduzione in differenti condizioni e su tutti gli altri aspetti del ciclo vitale della *P. galaxiae*. La relazione esistente tra taglia e ciclo vitale mette in luce l'importanza di raccogliere dati sulla distribuzione della taglia cellulare nelle retinate per trovare tracce del ciclo vitale.

Marcati cambiamenti nella distribuzione di taglia e di forma sono stati osservati durante i 3 periodi di picco della *P. galaxiae*, i.e. inizio primavera, tarda primavera e estate. Nel Golfo di Napoli, questi periodi sono caratterizzati da condizioni molto diverse di temperatura, stabilità della colonna d'acqua, disponibilità di nutrienti e di luce, e da differenti popolazioni di fito- e zooplancton.²⁶ Per tale motivo, esistono probabilmente significative differenze fisiologiche ed ecologiche tra i morfotipi di *P. galaxiae*. In alcune diatomee, *Chaetoceros curvisetus* Cleve, cellule di diversa taglia mostrano differenti risposte fisiologiche alla temperatura,¹⁴ cosa che può portare alla fioritura di classi di taglia selezionate dal cambiamento delle condizioni ambientali. Le differenze fisiologiche, così come le differenti condizioni ambientali, potrebbero avere implicazioni per la produzione di DA nelle popolazioni naturali di *P. galaxiae*,²⁸ con conseguenti variazioni della loro tossicità durante l'anno.

Da una prospettiva evolutiva, la variabilità di taglia, forma e formazione di colonie durante tutto il ciclo vitale può essere vista come una strategia ottimale delle diatomee per colonizzare un ampio range di nicchie ecologiche. D'altro canto, la discontinuità osservata tra le fioriture dominate da diversi morfotipi potrebbe essere interpretata come una segregazione temporanea del ceppo che potrebbe condurre all'evoluzione della specie. Basandosi sui ceppi isolati in un ristretto periodo dell'anno, abbiamo dimostrato che c'è un'omogeneità molecolare e una continuità morfologica tra i morfotipi di taglia piccola e media. Comunque, non possiamo escludere che esistono o esisteranno differenze molecolari e isolamento riproduttivo tra le popolazioni che fioriscono in diversi periodi dell'anno. Indagini molecolari estese durante tutto l'anno, accoppiate con studi di laboratorio sulla fisiologia e sul ciclo vitale sono richieste per fare luce sulle relazioni tra la morfologia, l'ecologia e la fisiologia di questa specie molto interessante di diatomea.

Filogenia LSU rDNA

L'allineamento delle sequenze non presentava problemi lungo le 868 paia di basi dei domini D1-D3 dell'LSU rDNA. E' stato trovato un livello veramente basso di polimorfismo nelle 7 *Pseudo-nitzschia galaxiae* provenienti dal Golfo di Napoli, con la scoperta di sole 3 mutazioni. La percentuale di siti polimorfici era 0.1; ogni sito era poco informativo. I ceppi di *P. galaxiae* del Golfo di Napoli erano quasi identici (distanza genetica 0.0001). Quando i ceppi di *P. galaxiae* di Sidney e del Messico sono stati aggiunti a quelli napoletani, la percentuale di siti polimorfici è aumentata a 0.4.

L'allineamento totale, in cui sono state considerate tutte le specie di *Pseudo-nitzschia*, mostra 86 siti polimorfici, 55 dei quali sono poco informativi.

Le sequenze di *P. galaxiae* avevano in comune 10 punti di mutazione; 8 di questi erano presenti anche in altre specie di *Pseudo-nitzschia*, mentre 2 (450 e 460 bp nell'allineamento) erano unici per questa specie (sinapomorfia)

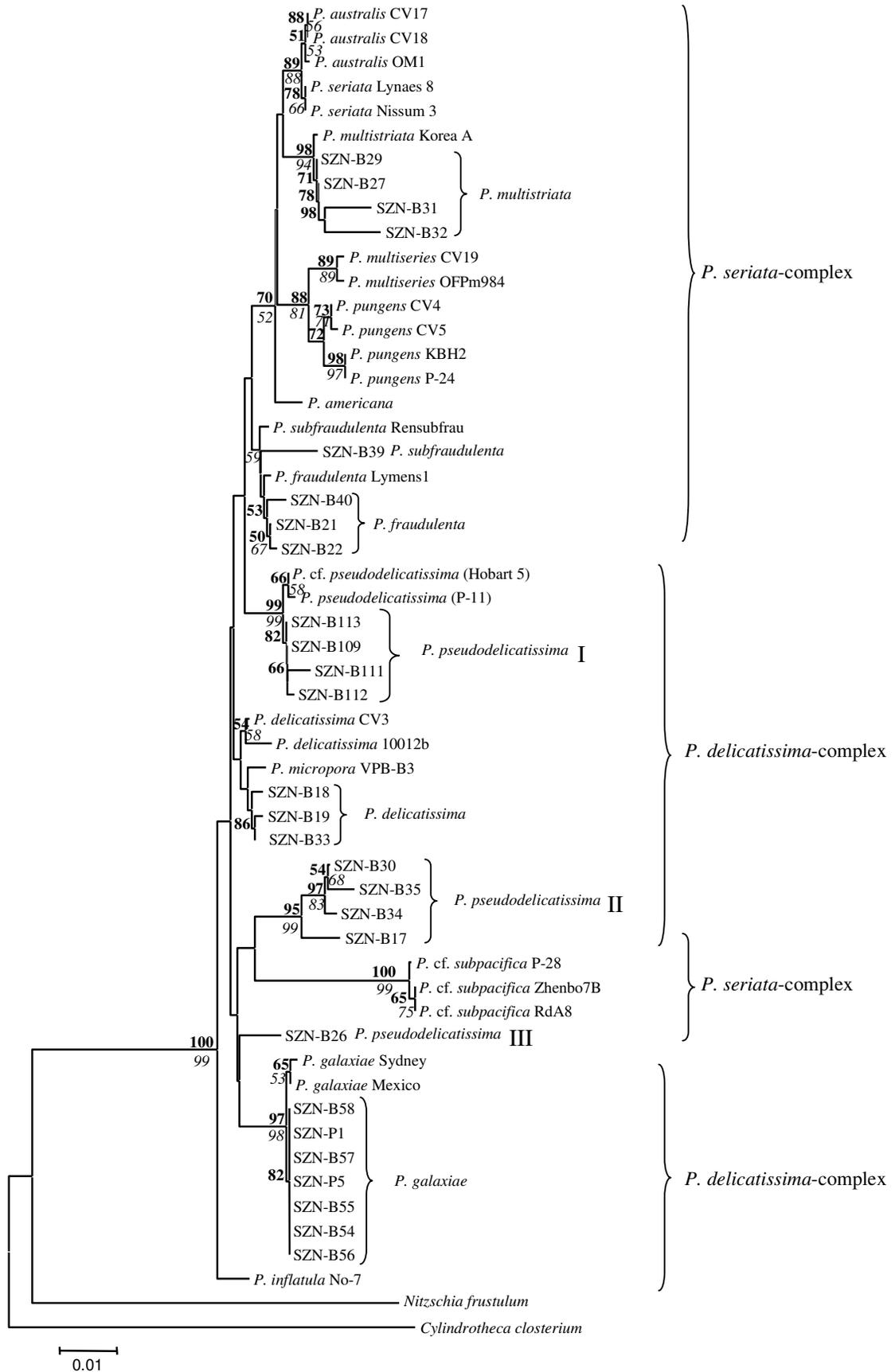
Siti di mutazione trovati per la *P. galaxiae*. Le mutazioni nei siti 450 e 460 sono uniche per la *P. galaxiae*.

| Posizione | 140 | 202 | 448 | 450 | 460 | 462 | 504 | 555 | 565 | 567 |
|-------------------------|-----|---------|-------|-----|-----|-------|-----|-------|---------|-------|
| 5'-3' | | | | | | | | | | |
| | A | C | T | T | A | G | T | T | T | A |
| Specie di | | | | | | | | | | |
| <i>Pseudo-nitzschia</i> | A/G | G/T/A/C | G/A/T | C | G | T/C/G | T/C | G/A/T | G/A/T/C | T/A/C |

Gli alberi Neighbor-Joining e Maximum Parsimony, costruiti sull'allineamento totale, hanno mostrato la stessa topologia. L'albero NJ, con entrambi i valori bootstrap e parsimony, è mostrato in seguito.

Le relazioni filogenetiche tra i ceppi della stessa specie avevano alto supporto bootstrap, mentre i rami non avevano supporto bootstrap a livello sovraspecifico. Tutti i ceppi di *P. galaxiae* sono stati raggruppati a formare un gruppo genetico fortemente supportato, in cui i ceppi del Golfo di Napoli e quelli delle altre aree formavano 2 sottogruppi genetici separati.

Albero di Neighbor-Joining



I ceppi di *P. pseudodelicatissima* mostravano una peculiare posizione filogenetica nelle analisi LSU rDNA. Solo 4 dei 9 ceppi del Golfo di Napoli (*P. pseudodelicatissima I*) sono stati raggruppati con i ceppi delle altre aree. Altri 4 ceppi (*P. pseudodelicatissima II*) hanno formato un gruppo genetico tutto napoletano, chiaramente distinto.

Infine, i ceppi SZN-B26 (*P. pseudodelicatissima III*) sono stati posti da soli in una posizione non ben risolta dell'albero.

Il gruppo genetico della *P. pseudodelicatissima* era relativamente più omogeneo, sebbene includeva un ceppo di *P. micropora*. Per le altre specie di *Pseudo-nitzschia*, come la *P. fraudulenta* e la *P. multistriata*, ceppi della stessa specie sono stati raggruppati, indipendentemente dalla loro origine geografica. *P. multistriata* formava un gruppo genetico ben supportato, mentre la separazione tra *P. fraudulenta* e *P. subfraudulenta* non era ben supportata. I ceppi *P. pungens* e *P. multiseriis* formavano 2 gruppi ben distinti, così come *P. seriata* e *P. australis*. *P. americana* si trova da sola alla base di un gruppo genetico più grande, che include le specie *P. pungens*, *P. multiseriis*, *P. multistriata*, *P. seriata* e *P. australis*. *P. inflatula* si trova alla base dell'albero filogenetico, separata da tutte le altre specie di *Pseudo-nitzschia*.

La filogenia LSU conferma che la specie trovata nel Golfo di Napoli è effettivamente la *Pseudo-nitzschia galaxiae* e che, indipendentemente dalla taglia e dalla forma, tutti i ceppi esaminati sono strettamente correlati. La diversità genetica intraspecifica complessiva nella *P. galaxiae* è più bassa che in altre specie di *Pseudo-nitzschia*.¹⁴ I ceppi napoletani potrebbero essere così simili perché la maggior parte di loro deriva dallo stesso campione. Comunque, il basso livello di polimorfismo mostrato dai ceppi non napoletani suggerisce

che la *P. galaxiae* ha una diversità intraspecifica più bassa di quella di altre specie di *Pseudo-nitzschia*.⁶

Tutti i ceppi di *P. galaxiae*, a prescindere dalla loro origine geografica, condividono alcuni siti caratteristici lungo l'allineamento dell'LSU rDNA. Due siti erano unici per la *P. galaxiae* e da soli bastavano per permettere la progettazione di una sonda molecolare specie-specifica.²⁹ Le sonde potrebbero essere uno strumento utile per questa specie, data la sua alta variabilità morfologica e il rischio di mancata identificazione. Quando si passa dal livello di specie all'intera filogenia del genere *Pseudo-nitzschia*, è evidente una mancanza di risoluzione. In studi precedenti,⁵ la mancanza di risoluzione è stata attribuita al numero limitato di sequenze considerate. Comunque, l'uso di più specie e ceppi in quest'analisi non ha migliorato la risoluzione a livello sovraspecifico, anzi ha prodotto alcuni ambigui risultati addizionali. In particolare, si è evidenziata la non chiara posizione filogenetica della *P. pseudodelicatissima*, con ceppi che si dividono in 3 diversi gruppi genetici (*P. pseudodelicatissima I, II e III*). La *P. pseudodelicatissima* è stata descritta come non omogenea dal punto di vista morfologico, con almeno 2 morfotipi che sono distinti sulla base della struttura dei poroidi tra le strie.^{30,1} I poroidi possono essere o tetra/esapartiti, a formare un tipo di rosone, o bipartiti. Cosa molto interessante, i poroidi della *P. pseudodelicatissima I* del Golfo di Napoli erano tutti bipartiti, mentre quelli del gruppo genetico *II e III* mostravano una tipica forma a rosone. Ciò indica che nella *P. pseudodelicatissima* potrebbero celarsi almeno 2 o eventualmente 3 specie distinte, come già indicato da Hasle.³¹ L'uso di marcatori molecolari multipli e/o più sensibili accoppiato con un'analisi morfologica più dettagliata è richiesto per chiarire la tassonomia di questa unità

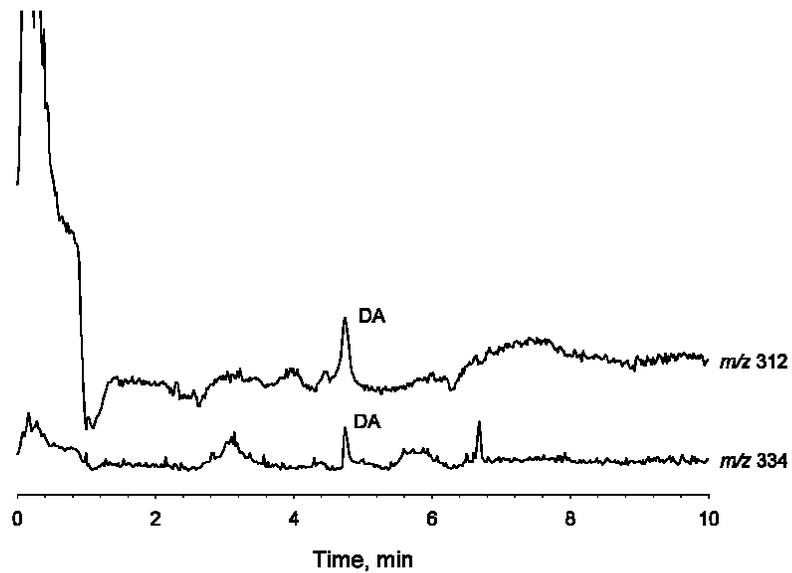
tassonomica. La mancanza di caratteristiche chiaramente distintive e la variabilità strutturale in alcune unità tassonomiche può anche essere un'indicazione di una recente evoluzione della specie in questi pennati del plancton che saranno analizzati anche usando esperimenti di fecondazione incrociata.

Tossicità

Poiché nove specie di *Pseudo-nitzschia* sono comunemente note come produttrici di acido domoico, è risultata necessaria, un'indagine tossicologica su questo ulteriore ceppo di *P. galaxiae* del Golfo di Napoli, finora mai riscontrato in questa zona. Abbiamo quindi eseguito indagini di tipo LC-MS per verificare la presenza della biotossina in questione impiegando il metodo HILIC-MS da noi messo a punto.

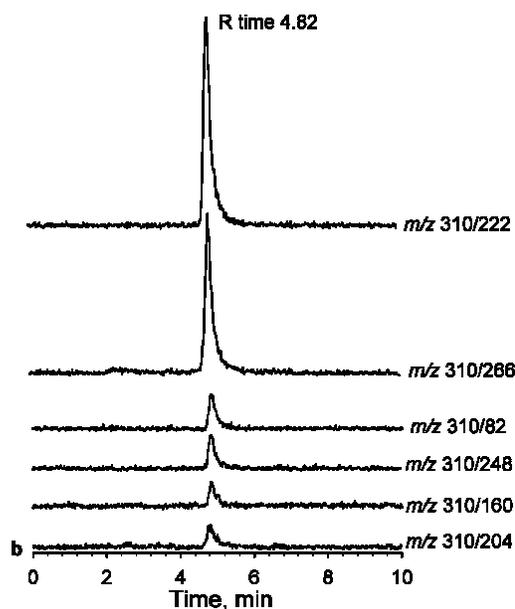
Ciascun campione è stato estratto con MeOH/H₂O 1:1. Una porzione dell'estratto grezzo è stata sottoposta a clean-up attraverso estrazione in fase solida (SPE) utilizzando come eluente un tampone costituito da acido citrico e citrato di ammonio, ed analizzata via HILIC-MS.

Le analisi LC-MS in modalità SIM a ioni positivi degli eluati dell'SPE hanno mostrato un picco cromatografico con lo stesso tempo di ritenzione dell'acido domoico in 2 dei 7 ceppi esaminati, chiamati SZN-B24 e SZN-B56.



Analisi SIM-MS in modalità positiva dell'eluato SPE di SZN-B54

Successivamente, esperimenti di MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) condotti sia a ioni positivi che negativi, hanno fornito ulteriori conferme e hanno permesso la rivelazione dell'acido domoico persino negli estratti grezzi dei 2 ceppi risultati positivi. Il tempo di ritenzione (4.80 min.), la presenza di 6 frammenti diagnostici dell'acido domoico in entrambe le modalità di ionizzazione e i rapporti ionici hanno confermato pienamente la presenza di acido domoico nei 2 campioni positivi.



Analisi MRM in modalità a ioni negativi dell'estrazzo grezzo di SZN-B54.

Il confronto con uno standard di l'acido domoico ha permesso di calcolare valori di concentrazione rispettivamente di $3.6 \cdot 10^{-4}$ pg/cellula e $7.8 \cdot 10^{-7}$ pg/cellula nei campioni SZN-B54 e SZN-B56.

Come si può notare, l'acido domoico rivelato nei 2 campioni positivi ha valori di concentrazione molto bassi. Questi valori erano molto più bassi di quelli trovati nella sola altra specie del Golfo di Napoli risultata tossica, la *Pseudo-nitzschia multistriata*,⁶ valori che erano già tra i più bassi riportati in letteratura.²⁸ In ogni caso, i risultati ottenuti indicano per la prima volta la *P. galaxiae* come una specie tossica, potenzialmente responsabile di una pericolosa fioritura algale, questo risultato è in contrasto con i precedenti risultati ottenuti su altri ceppi.⁴ Probabilmente, queste differenze potrebbero essere dovute all'alta sensibilità del metodo HILIC-MS usato, ed in particolare all'alta selettività della tecnica MRM, dovuta all'eliminazione dei segnali degli altri

contaminanti coestratti. Comunque, non possono essere escluse variazioni della produzione di tossina in ceppi diversi di *P. galaxiae* o in differenti condizioni fisiologiche. Infatti, alcuni dei cloni riconosciuti come non tossici in quest'analisi potrebbero essere geneticamente identici a quelli rivelatisi tossici, poiché essi derivavano dagli stessi tubi di coltura diluita dai quali sono stati isolati i ceppi tossici.

Nell'analisi delle specie potenzialmente tossiche, una particolare attenzione deve essere dedicata al metodo analitico da noi impiegato, allo scopo di evitare falsi negativi dovuti alla bassa sensibilità dello strumento o ai grandi limiti d'indagine del metodo, piuttosto che ad una reale non tossicità della specie. Il metodo LC-MS usato ha grandi potenzialità per ulteriori ricerche dell'acido domoico in altre specie di *Pseudo-nitzschia* finora ritenute non tossiche. In particolare, la modalità d'acquisizione MRM è consigliata perché è altamente selettiva, molto sensibile e presenta un rumore di fondo nei cromatogrammi quasi nullo. La capacità di produrre acido domoico, anche se in livelli molto bassi, è un'informazione importante a scopo organizzativo, soprattutto considerando che la velocità della produzione di acido domoico può variare con lo stato fisiologico delle cellule e può essere fortemente influenzata dalle condizioni ambientali.^{32,33}

Conclusioni

Grazie alle indagini morfologiche eseguite presso la Stazione Zoologica di Napoli è stato quindi possibile individuare, in retinate provenienti dal Golfo di Napoli, questo nuovo ceppo di *Pseudo-nitzschia*, la *P. galaxiae*.

Ulteriori analisi di tipo LSU rDNA hanno confermato l'identità della nuova specie, che a causa della sua similarità con altre diatomee, normalmente presenti nel Mar Mediterraneo, potrebbe aver celato finora la sua presenza.

In seguito alle indagini LC-MS eseguite presso i nostri laboratori, si è anche evidenziata, in due dei sette campioni di *P. galaxiae* analizzati, la presenza di acido domoico, tossina mai prima d'ora rivelata in questa specie seppur prodotta da altre specie appartenenti allo stesso genere.

Tale riscontro è stato possibile solo grazie all'elevata selettività e sensibilità del metodo LC-MS da noi messo a punto, che ci ha permesso di rivelare concentrazioni realmente esigue della tossina in questione. Per questo, il metodo HILIC si è dimostrato un utile strumento per il monitoraggio rapido e sicuro delle microalghe e dei mitili dei nostri mari, teso alla rivelazione preventiva di acido domoico con lo scopo di evitare gravi intossicazioni causate dall'ingestione di molluschi contaminati. Questo tipo di controllo, pur causando ingenti danni economici agli allevamenti di mitili, è l'unico mezzo per evitare problemi alla salute pubblica connessi alla presenza di questa nuova diatomea nel Golfo di Napoli.

L'aver riscontrato la presenza di tale tossina nei nostri mari mette in evidenza l'importanza di un controllo continuo, teso ad evitare gravi intossicazioni causate dall'ingestione di molluschi contaminati.

3.3.2 Parte sperimentale

Culture. Sei dei sette ceppi di *Pseudo-nitzschia galaxiae* sono stati ottenuti da colture seriali diluite (SDC) di retinate, raccolte nel Maggio del 2002 da acque

superficiali nella zona MC, a 2 miglia nautiche da Napoli (come mostrato nella tabella seguente).

Il ceppo SZN-B58 è stato isolato da un campione superficiale raccolto nella stessa zona MC nel Luglio 2001. In tutti i casi, sono state allestite colture unicellulari da una singola cellula o da una singola catena di cellule e coltivate in mezzo di coltura f/2, con aggiunta di silice,³⁴ preparate con acqua marina oligotrofica (36 psu) e mantenute alla temperatura di 15°C, con un'irradiazione fotonica di 70-80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ed un regime di 12 ore di luce e 12 di buio.

Ceppi di P. galaxiae analizzati per morfologia, contenuto di acido domoico e filogenia

| Ceppo | Data di raccolta | Data di isolamento | Campione |
|--------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|
| SZN-B54 | 29 Maggio 2001 | 13 Luglio 2001 | SDC -4II |
| SZN-B55 | 29 Maggio 2001 | 13 Luglio 2001 | SDC -4II |
| SZN-B56 | 29 Maggio 2001 | 13 Luglio 2001 | SDC -4II |
| SZN-B57 | 29 Maggio 2001 | 13 Luglio 2001 | SDC -4II |
| SZN-B58 | 18 Luglio 2001 | 18 Luglio 2001 | retinata |
| SZN-P1 | 29 Maggio 2001 | 10 Gennaio 2002 | SDC -4V |
| SZN-P2 | 29 Maggio 2001 | 10 Gennaio 2002 | SDC -4V |

Per la conta cellulare, le retinate sono state raccolte ogni 2 settimane dal 1984 e settimanalmente dal 1995 dalle acque superficiali del Golfo di Napoli

(Zona MC), all'interno di un programma di monitoraggio del plancton a lungo termine. I campioni sono stati fissati con formaldeide neutralizzata con CaCO_3 ad una concentrazione finale di 0.8% e contati con un microscopio ottico.³⁵ Le piccole cellule (10-25 μm) della *P. galaxiae* sono state contate separatamente dalle cellule più grandi. Sono stati esaminati ulteriori campioni del Mar Mediterraneo, provenienti dal Canale Aperto di Sicilia (Ottobre 1991), dal Mare delle Baleari (Marzo 2002), da Olbia (Sardegna, Mar Tirreno, Giugno 2002) e Chioggia (Venezia, Mar Adriatico, Maggio 2002). I due campioni più recenti sono stati gentilmente forniti da P. Di Dato (Università di Roma, Italia) e R. Casotti (Stazione Zoologica, Napoli).

Per le osservazioni ultrastrutturali delle frustale, il materiale organico è stato eliminato dai campioni in coltura usando una miscela di HNO_3 al 10% e H_2SO_4 al 40%, seguita da fasi di risciacquo con acqua distillata finché tutto l'acido è stato rimosso. Una goccia del materiale purificato è stata posta su un vetrino coperto Formvar e osservata con un microscopio Philips EM400. Per le retinate, una goccia del materiale fissato non purificato è stata posta nello stesso vetrino, asciugata, lavata con acqua distillata e osservata come prima.

Per misurare la lunghezza, aliquote di colture dei ceppi SZN-B54, SZN-B56, SZN-B58, SZN-P1 E SZN-P5 sono state fissate con formaldeide neutralizzata con CaCO_3 ad una concentrazione finale dello 0.8%. Un sottocampione di 50 cellule per clone è stato misurato con cadenza mensile per 13 mesi al microscopio ZEISS Axiophot a contrasto di fase, ad un ingrandimento di 400x. Le misurazioni dei ceppi SZN-P1 e SZN-P2 sono state terminate con anticipo, a causa della morte di queste colture. Le misure di lunghezza sono state fatte anche su sottocampioni di 50 cellule di *P. galaxiae* da

ognuno degli 11 campioni provenienti dalla zona MC, che corrispondevano alle fasi di maggior proliferazione dell'inizio della primavera del 1996-1998 e 2001 (4 campioni), e estate 1998-2002 (5 campioni).

Estrazione dei campioni. Le colture esaminate sono state concentrate e i pellet risultanti sono stati congelati a -80°C fino all'analisi.

Campioni di *P.galaxiae* usati per la ricerca di acido domoico

| Ceppo | Volume centrifugato (ml) | Numero di cellule (10^8 ml^{-1}) |
|---------|--------------------------|--|
| SZN-B54 | 600 | 11.0 |
| SZN-B55 | 609 | 2.1 |
| SZN-B56 | 595 | 6.0 |
| SZN-B57 | 595 | 1.7 |
| SZN-B58 | 600 | 6.5 |
| SZN-P1 | 400 | 7.0 |
| SZN-P2 | 400 | 1.6 |

Il pellet è stato estratto con una soluzione MeOH/H₂O (1:1, v/v) (3x250 µl) e filtrato tramite filtri a membrana Ultrafree-MC da 0.45 µm (Millipore Ltd, Bedford, MA, USA) a 6000 rpm per 10 minuti. Il volume del filtrato è stato aggiustato a 900 µl col solvente d'estrazione e analizzato direttamente all' LC-MS. Un'aliquota di 450 µl dell'estratto è stata portata a secco e successivamente sottoposta a clean-up tramite Solid Phase Extraction (SPE), usando la procedura suggerita da Quilliam et al.³⁷ Gli eluati sono stati analizzati all'LC-MS.

Analisi HILIC-MS. Per gli esperimenti LC-MS è stata usata la pompa ad alta pressione SP modello P4000 (ThermoFinnigan Separation Products, San

Josè, CA, USA) accoppiata ad uno spettrometro di massa Applied Biosystem API 2000 a triplo quadrupolo, equipaggiato con una sorgente turboion-spray (Thornhill, ON, Canada). La separazione LC è stata effettuata usando una colonna 5µm TosoHaas TSK-Gel Amide-80, 250x2 mm, eluita isocraticamente con una soluzione al 71% di acetonitrile/acqua contenente formiato d'ammonio 2mM e acido formico 3.5 mM, come suggerito da Quilliam et al.³⁹ La velocità del flusso era di 200 µl/min ed è stato usato un volume di iniezione del campione di 10 µl. Gli ioni protonati con m/z 312.5 e gli addotti col sodio a m/z 334.5 sono stati monitorati attraverso esperimenti SIM (*Selected Ion Monitoring*) in modalità ioni positivi, mentre lo ione $[M-H]^-$ a m/z 310.5 sono stati osservati in modalità a ioni negativi. I seguenti gruppi di 6 transizioni m/z 312/294, 312/266, 312/220, 312/193, 312/175 (energia di collisione 30 eV) e m/z 310/266, 310/248, 310/222, 310/204, 310/160, 310/82 (energia di collisione -25 eV) sono stati monitorati attraverso esperimenti di tipo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) rispettivamente a ioni positivi e negativi. Le transizioni più intense (m/z 310/266 e 310/222, in modalità a ioni negativi) sono state usate per le analisi quantitative. Un diretto paragone con soluzioni standard di acido domoico (Sigma Aldrich, Steinheim, Germania) iniettate in concentrazioni simili nelle stesse condizioni sperimentali ha permesso di determinare il contenuto di acido domoico negli estratti grezzi.

Amplificazione ed estrazione del DNA. Il DNA genomico è stato estratto da 150-200 ml di colture cresciute esponenzialmente, usando il DNA easy plant minikit (Qiagen, Genomics, Bothell, WA) seguendo le istruzioni per l'uso. Le condizioni di amplificazione per il DNA genomico e la strategia di clonaggio

per i frammenti PCR sono state le stesse applicate da Orsini et al.⁶ Le sequenze per l'LSU rDNA sono state ottenute con un Beckman Ceq 2000, usando il Dye-Terminator cycle sequencing kit (Beckman).

Analisi filogenetiche. Le sequenze LSU della *Pseudo-nitzschia galaxiae* sono state confrontate con le sequenze LSU della *Pseudo-nitzschia* disponibili nella GenBank .

Ceppi di diatomea usati per la filogenia LSU rDNA col numero d'accesso alla banca dati GenBank

| <i>Specie</i> | Numero d'accesso |
|---|------------------|
| <i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Lewin & Reimann | M87326 |
| <i>Nitzschia frustulum</i> (Kutzing) Grunow | AF417671 |
| <i>Pseudo-nitzschia americana</i> (Hasle) Fryxell | U41390 |
| <i>P. australis</i> Frenguelli | U41393 |
| <i>P. australis</i> | U40850 |
| <i>P. australis</i> (OM1) | AF417651 |
| <i>P. delicatissima</i> (Cleve) Heiden | AF416748 |
| <i>P. delicatissima</i> | AF416749 |
| <i>P. delicatissima</i> | AF416758 |
| <i>P. delicatissima</i> | U41391 |
| <i>P. delicatissima</i> (1001 2b) | AF417645 |
| <i>P. fraudulenta</i> (Cleve) Hasle | AF416750 |
| <i>P. fraudulenta</i> | AF416751 |
| <i>P. fraudulenta</i> | AF416762 |
| <i>P. fraudulenta</i> (Limens1) | AF417647 |
| <i>P. inflatula</i> (Hasle) Hasle (No7) | AF417639 |
| <i>P. micropora</i> Priisholm, Moestrup & Lundholm (VPB-B3) | AF417649 |
| <i>P. multiseriis</i> (Hasle) Hasle (OFFm984) | AF417655 |
| <i>P. multiseriis</i> | U41389 |
| <i>P. multistriata</i> (Takano) Takano | AF416753 |
| <i>P. multistriata</i> | AF416754 |
| <i>P. multistriata</i> | AF416756 |

| | |
|---|----------|
| <i>P. multistriata</i> | AF416757 |
| <i>P. multistriata</i> (Korea A) | AF417654 |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle | AF416747 |
| | |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> | AF416752 |
| | |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> | AF416755 |
| | |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> | AF416759 |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> | AF416760 |
| <i>P. cf. pseudodelicatissima</i> (Hobart 5) | AF417641 |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> (P-11) | AF417640 |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> SZN-B109 | |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> SZN-B111 | |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> SZN-B112 | |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> SZN-B113 | |
| <i>P. pungens</i> (Grunow ex Cleve) Hasle | U41392 |
| <i>P. pungens</i> | U41262 |
| <i>P. pungens</i> (KBH2) | AF417650 |
| <i>P. pungens</i> (P-24) | AF417648 |
| <i>P. seriata</i> (Cleve) Peragallo (Lynaes 8) | AF417653 |
| <i>P. seriata</i> (Nissum 3) | AF417652 |
| <i>P. subfraudulenta</i> (Hasle) Hasle | AF416761 |
| <i>P. subfraudulenta</i> Rensubfrau | AF417646 |
| <i>P. cf. subpacifica</i> (Hasle) Hasle (Zhenbo 7B) | AF417644 |
| <i>P. cf. subpacifica</i> (P-28) | AF417643 |
| <i>P. cf. subpacifica</i> (RdA8) | AF417642 |
| <i>P. galaxiae</i> (Sydney) Lundholm & Moestrup | + |
| <i>P. galaxiae</i> (Mexico) | + |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-B54 | |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-B55 | |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-B56 | |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-B57 | |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-B58 | |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-P1 | |
| <i>P. galaxiae</i> SZN-P5 | |

SZN: ceppi isolati nel Golfo di Napoli

+: sequenze gentilmente fornite da N. Lundholm

Cylindrotheca closterium e *Nitzschia frustulum* sono state usate rispettivamente come outgroup e ingroup. Entrambe le specie sono diatomee pennate e, in accordo con la filogenia LSU rDNA che include la *Pseudonitzschia* e i generi vicini,⁵ la prima è alla base del gruppo genetico che

raggruppa le specie *Pseudo-nitzschia*, mentre la seconda si pone immediatamente fuori del gruppo genetico della *Nitzschia-Pseudo-nitzschia*. L'allineamento è stato fatto usando Custal W.³⁸ nel Bioedit 4.5.8. computer package⁴⁰.

Sono state eseguite analisi di distanza usando il Bioedit 4.5.8. computer package;⁴⁰ il polimorfismo nucleotidico è stato calcolato usando DNAsp 3.0 version.⁴¹ L'albero Neighbor-Joining (NJ)⁴² è stato costruito usando i parametri di distanza Kimura 2 e scegliendo l'opzione Neighbor dal Mega 2.1 computer package;⁴³ gli alberi Maximum Parsimony sono stati ottenuti usando l'opzione parsimony in Mega 2.1.⁴³

3.3.3 Riferimenti bibliografici

1. Hasle, G. R., **1965**. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. Skr. Nor. Vidensk-Akad. Oslo I. Mat-Naturvidensk
2. Hasle, G. R., **1965**. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. Skr. Nor. Vidensk-Akad. Oslo I. Mat-Naturvidensk
3. Hasle, G. R., *J. Phycol.* **1995**, *31*, p. 428.
4. Bates, S. S., Bird, C. J., Freits, A. S. D. W., Foxall, R., Gilgan, M. W., Hanic, L. A., Johnson, J. E., McCulloch, A. W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M. A., Sim, P. G., Smith, J. C., Rao, D. V. S., Todd, E. D. C., Walter, J. A., Wright, J. L. C., *Aquat. Sci.* **1989**, *46*, p. 1203.
5. Ludholm, N., Moestrup, O. *Phycologia*, **2002**, *41*, p. 594.

6. Lundholm, N., Daugbjerg, N., Moestrup, O.,. *Eur. J. Phycol.*, **2002**, *37*, p. 115.
7. Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J., Montresor, M.,. *Eur. J. Phycol.* **2002**, *37*, p. 247.
8. Schroder, B., *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, **1901**, *14*, p. 1.
9. Issel, R.,. *Pubbl. Stn. Zool. Napoli*, **1934**, *14*, p. 1.
10. Zingone, A., Licandro, P., Nardella, M., Sarno, D., **2002**. Seasonality and interannual variation in the occurrence of species of the genus *Pseudonitzschia* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). In: Abstract book of the 10th International Conference on Harmful Algae, October 21-25 **2002**. St. Pete Beach, Florida. US, p. 315
11. Zingone, A., Licandro, P., Sarno, D., **2003**. Revising paradigms and myths of phytoplankton ecology using biological time series. In: Briand, F. (Ed.), *Mediterranean biological time series*, in press.
12. Round, F. E., Crawford, R. M., Mann, D. G., **1990**. *The diatoms – Biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge
13. Hasle, G. R., von Stosch, H. A., Syvertsen, E. E., *Bacillaria*, **1983**, *6*, p.9.
14. Hargraves, P. E., Guillard, R. R. L.,. *Phycologia* **1974**, *13*, p. 163.
15. Ribera d'Alcalà, M., Conversano, F., Corato, F., Licandro, P., Mangoni, O., Marino, D., Mazzocchi, M. G., Modigh, M., Montresor, M., Nardella, M., Saggiomo, V., Sarno, D., Zingone, A.,. *Sci. Mar.* **2003**, *67*, in press
16. Estrada, M., **1980**. Composició taxonòmica del fitoplancton en una zona pròxima a la desembocadura del rio Besòs (Barcelona), de octubre de 1978 a marzo de 1979. *Invest. Pesq.* *44*, 275-289
17. Margalef, R., *Mem. R. Acad. Ciencias artes Barcelona*, **1995**, *60*, p. 3.

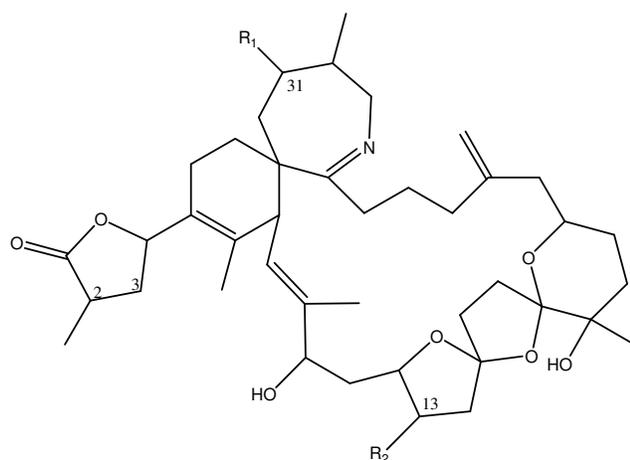
18. Travers, M., *Ann. Inst. Oceanogr. Paris*, **1975**, *51*, p. 51.
19. Puddu, A., Lombardi, F., Sequi, R., *Quad. Ist. Ric. Acque*. **1983**, *66*, p. 169.
20. Rabitti, S., Bianchi, F., Boldrin, A., Ros, L. D., Socal, G., Totti, C., *Oceanol. Acta*, **1994**, *17*, p. 297.
21. Abboud-Abi Saab, M., *Lebanese Science Bulletin*, **1985**, *1*, p. 197.
22. Mann, D. G., **1988**. Why didn't Lund see sex in *Asterionella*? A discussion of the diatom life cycle in nature. In: Round, F. E. (Ed.), *Algae and the aquatic environment*. Biopress, Bristol, 29, pp. 385-412
23. Mann, D. G., **2002**. Diatom life cycle. In: Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B., Dale, B. (Eds.), *LIFEHAB: Life history of microalgal species causing harmful blooms*. European Commission, Brussels, pp. 13-17
24. Rojo, C., Kiss, K. T., Alvarez-Cobelas, M., Rodrigo, M. A., *Arch. Hydrobiol.* **1999**, *145*, p. 479.
25. Hiltz, M., Bates, S. S., Kaczmarek, I., *Phycologia*, **2000**, *39*, p. 59.
26. Davidovich, N. A., *J. Plant Physiol.* **1994**, *41*, p. 220.
27. Davidovich, N. A., Bates, S., *J. Phycol.* **1998**, *34*, p. 126.
28. Furnas, M., *J. exp. Mar. Biol. Ecol.*, **1978**, *34*, p. 97.
29. Bates, S. S., **1998**. ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In: Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeef, G. M. (Eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 405-426
30. Scholin, C. A., Buck, K. R., Britschgi, T., Cangelosi, G., Chavez, F. P., *Phycologia*, **1996**, *35*, p. 190.
31. Hallegraeef, G. M., *Bot. Mar.* **1994**, *37*, p. 397.
32. Hasle, G. R., *Harmful Algae*, **2002**, *1*, p. 137.

33. Maldonado, M. T., Highes, M. P., Rue, E. L., *Limnol. Oceanogr.*, **2002**, *47*, p. 515.
34. Pan, Y., Bates, S. S., Cembella, A. D., *Nat. Toxins* **1998**, *6*, p. 127.
35. Guillard, R. R. L., Hutchinson Ross Publishing Co., Stroudsbero, PA, **1983**, pp. 108-132
36. Utermohl, H., *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, **1958**, *9*, p. 1.
37. Quilliam, M. A., Xie, M., Hardstoff, W. R., *J. AOAC Int.*, **1995**, *78*, p. 543.
38. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibbison, T. J., *Nucleic Acid Res.* **1994**, *22*, p. 4673.
39. Quilliam, M. A., Hess, P., Dell'Aversano, C., **2001**. recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. In: deKoe, W. J., Samson, R. A., van Egmond, H. P., gilbert, J., Sabino, M. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the Turn of the Century*. Wageningen, The Neatherlands, pp. 383-391
40. Hall, T. A., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1999**, *41*, p. 95.
41. Rozas, J., Rozas, R., *Bioinformatics*, **1999**, *15*, p. 174.
42. Saitou, N., Nei, M., *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, p. 406.
43. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M., **2001**. MEGA2 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA

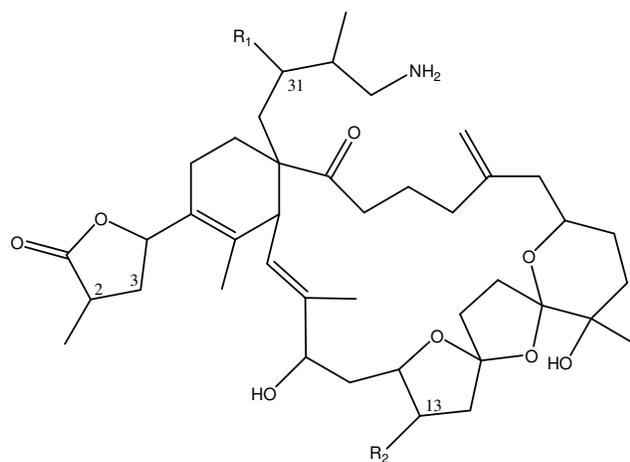
3.4 **Analisi LC-MS di *Alexandrium ostenfeldii*: una nuova minaccia nel Mar Adriatico**

Gli spirolidi sono una famiglia di biotossine marine tipiche delle coste Europee e Nord Americane. I primi episodi di disturbi legati a questo genere di tossine si registrarono agli inizi degli anni '90 in seguito all'ingestione di molluschi bivalvi raccolti lungo le coste orientali della Nova Scotia, Canada¹. L'iniezione intraperitoneale nel topo (IP) degli estratti lipofili di mitili contaminati provocava una sindrome tossica inconsueta, caratterizzata da piloerezione, iperestensione degli arti posteriori, inarcamento della coda, neuroconvulsioni e rapida morte entro 3-20 min dall'iniezione. Studi tossicologici in vivo sul topo hanno poi fornito valori di LD 50 rispettivamente di 40 µg/kg e di 1 mg/kg per IP e per somministrazione orale². Ulteriori studi hanno riscontrato negli spirolidi un'attività da antagonisti colinergici dei recettori muscarinici nonché da deboli attivatori dei canali del Ca⁺⁺ transmembrana L-type nei mammiferi¹. La tossicità sull'uomo, resta però ancora un punto da chiarire sebbene nel periodo in cui la presenza di spirolidi veniva rivelata nei mitili provenienti dalla Nova Scotia fossero stati registrati casi di disturbi gastrici e di tachicardia sull'uomo in seguito al consumo di tali mitili contaminati.

Da un punto di vista chimico-strutturale, gli spirolidi sono caratterizzati dalla presenza di tre cicli eterici legati da spirogiunzioni e da una inconsueto sistema ciclico a 7 termini contenente una funzione imminica spiro legata. Il numero di tossine appartenenti a questa classe sta crescendo notevolmente nel corso degli anni con l'inserimento di molteplici isomeri e molecole con piccole modificazioni strutturali^{1,3}.



| Spirolide | R ₁ | R ₂ | Δ |
|------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A | H | CH ₃ | Δ ^{2,3} |
| B | H | CH ₃ | |
| C | CH ₃ | CH ₃ | Δ ^{2,3} |
| 13-desMe-C | CH ₃ | H | Δ ^{2,3} |
| D | CH ₃ | CH ₃ | |
| 13-desMe-D | CH ₃ | H | |



| | | | |
|---|---|-----------------|------------------|
| E | H | CH ₃ | Δ ^{2,3} |
| F | H | CH ₃ | |

Gli spiroolidi maggiormente noti sono: gli spiroolidi A, B, C, D, E ed F insieme a derivati desmetilici degli spiroolidi C (13-desMeC) e D (13-desMeD). Piccole variazioni strutturali possono tradursi in grandi differenze di tossicità.

Infatti, la porzione strutturale responsabile della bioattività di questi composti è l'anello imminico integro. Di conseguenza l'idrolisi dell'immina ciclica a gruppo chetonico ed amminico, che si verifica nei mitili dando origine

agli spirolidi E ed F, trasforma tali molecole in composti non tossici⁴. Di recente è stato identificato l'organismo produttore di tali tossine: si tratta del dinoflagellato *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech and Tangen (1985) proveniente dallo Ship Harbour, Nova Scotia⁵⁻⁷, seppure nessun caso di avvelenamento umano sia ricollegabile in maniera certa a fioriture (*blooms*) di tale microorganismo.

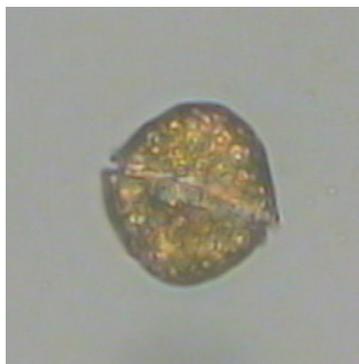
E' stato osservato come l'*A. ostenfeldii* popoli ampiamente le acque temperate della Danimarca⁸, Norvegia⁹, Scozia¹⁰, Canada versante Atlantico⁷ e Nuova Zelanda¹¹. Tuttavia estratti grezzi di ceppi differenti di *A. ostenfeldii* provenienti da zone costiere diverse, hanno mostrato importanti e talvolta complesse differenze nella tossicità e nel profilo tossicologico. In particolar modo, in Nova Scotia, le cellule di *A. ostenfeldii* contenevano elevati livelli di spirolidi A, B, C, D, 13-desMeC and 13-desMeD, ma gli stessi composti non furono rivelati in ceppi derivanti dalla Nuova Zelanda, dove invece venivano prodotte tossine responsabili dell'avvelenamento paralitico da molluschi¹¹ (*Paralytic Shellfish Poisoning*, PSP). A rendere ancor più confusa la situazione, è stata la scoperta di ceppi provenienti dalla Scandinavia che producevano sia spirolidi che PSP tossine, anche se in concentrazioni molto basse⁶.

In Italia, la presenza di *A. ostenfeldii* non era mai stata rivelata fino ad oggi e una parte del mio lavoro, ha previsto la descrizione del primo riscontro del microorganismo *Alexandrium ostenfeldii* lungo le coste dell'Emilia Romagna. A tale proposito ho condotto una dettagliata analisi tramite l'impiego di tecniche di accoppiamento cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) del profilo tossico di una coltura cellulare di *A. ostenfeldii* ottenuta

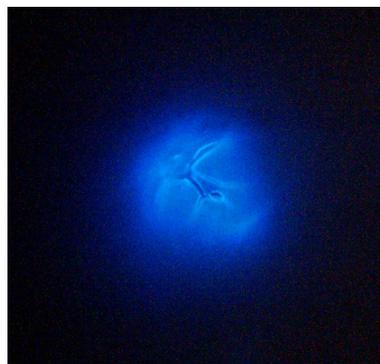
dall'isolamento di un ceppo di tale dinoflagellato da una retinata, raccolta nel Novembre 2003 durante una fioritura.

3.4.1 Risultati

Nel periodo compreso tra Novembre 2003- Febbraio 2004, lungo le coste dell'Emilia Romagna, nella zona di Cesenatico, è stato rivelato, un incremento della popolazione di cellule di *A. ostensfeldii* rispetto a quanto riscontrato in precedenza dove solo sporadicamente, si osservava la presenza di un esiguo numero di cellule di *A. ostensfeldii*. La concentrazione più elevata è stata registrata verso la fine del Novembre 2003 (15.612 cellule per litro) con un successivo decremento. Le cellule presentavano caratteristiche morfologiche perfettamente coincidenti con quelle riportate per il dinoflagellato *A. ostensfeldii*¹²: le cellule si presentavano grandi, quasi sferiche, con diametro 40-55 µm e con teca sottile. Nella prima placca apicale era presente un grande poro ventrale.



Cellula a fresco



Cellula in epifluorescenza colorata con il calcofluor

Dopo un'iniziale settimana di ritardo, le colture unialgali di *A. ostensfeldii* hanno raggiunto una densità massima di circa 18,500 cellule ml⁻¹ in 25-30

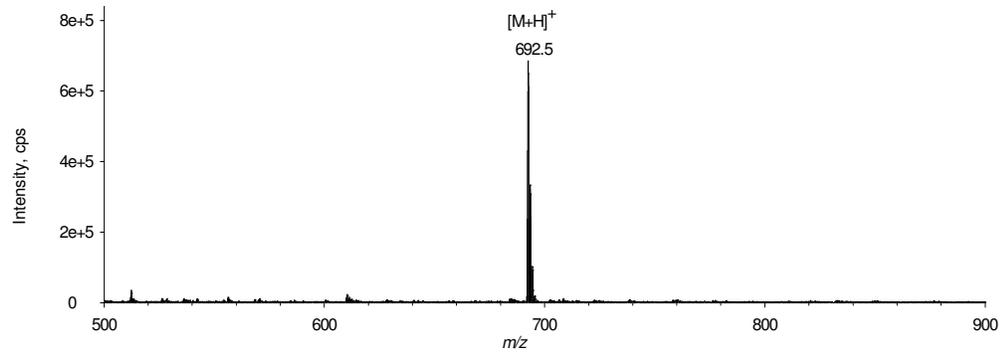
giorni. E' stato così prelevato un campione contenente 49.000.000 di cellule al fine di valutarne il profilo tossico tramite analisi LC-MS, con lo scopo di rivelare l'eventuale presenza di tossine precedentemente rivelate in colture di *A. ostenfeldii* come le PSP tossine e gli spirolidi^{11,5}.

Le colture cellulari sono state estratte tramite sonicazione con una soluzione metanolo/acqua (8:2, v/v) e l'estratto grezzo è stato direttamente analizzato in cromatografia liquida ad interazioni idrofiliche/MS (HILIC-MS). La separazione cromatografica è stata effettuata su una colonna TSK gel Amide 80 ed una fase mobile addizionata di un opportuno tampone ammonio formiato/acido formico, come previsto per una rapida e selettiva determinazione delle PSP tossine¹³. Lo spettrometro di massa era equipaggiato di un'interfaccia turboionspray e le analisi sono state condotte in modalità a ioni positivi. Sono stati registrati esperimenti *Selected Ion Monitoring* (SIM) in modalità positiva per la maggior parte delle PSP tossine (saxitossina, neosaxitossina, gonyautossine 1-5 ed *N*-sulfogonyautossine 1-4). Il tracciato ottenuto non mostrava la presenza di alcun picco corrispondente ad alcuna PSP tossina. Per escludere definitivamente la presenza della saxitossina e dei suoi derivati, un'aliquota delle cellule è stata estratta con una soluzione 0.1 M di acido acetico, come previsto per l'estrazione esaustiva delle PSP tossine dal fitoplancton¹⁴. L'estratto grezzo è stato analizzato mediante HILIC-MS in modalità *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) ancora una volta mostrando l'assenza delle più comuni PSP tossine. L'estratto crudo metanolo/acqua (8:2, v/v) derivante dal ceppo Adriatico di *A. ostenfeldii* è stato successivamente sottoposto ad analisi LC-MS per indagare la presenza della maggior parte degli spirolidi noti. Infatti l'LC-MS è la più comune tecnica analitica impiegata per la

rivelazione di tali tossine, in quanto permette il monitoraggio degli spiroolidi noti contemporaneamente all'identificazione di alcuni nuovi derivati attraverso l'interpretazione del pattern di frammentazione mostrato dagli esperimenti di MS/MS¹⁵. La separazione cromatografica si è ottenuta su una colonna a fase inversa Hypersil C8 BDS ed una fase mobile contenente ammonio formiato e acido formico, come suggerito da Quilliam *et al.* per le analisi degli spiroolidi e delle altre tossine lipofile¹⁶. Gli esperimenti in modalità SIM sono stati condotti selezionando gli ioni $[M+H]^+$ per tutti gli spiroolidi mostrati qui di seguito:

| Spirolide | $[M+H]^+$ (<i>m/z</i>) |
|------------------|--|
| A | 692.5 |
| B | 694.5 |
| C | 706.5 |
| 13-desM-C | 692.5 |
| D | 708.5 |
| 13-desM-D | 694.5 |
| E | 710.5 |
| F | 712.5 |

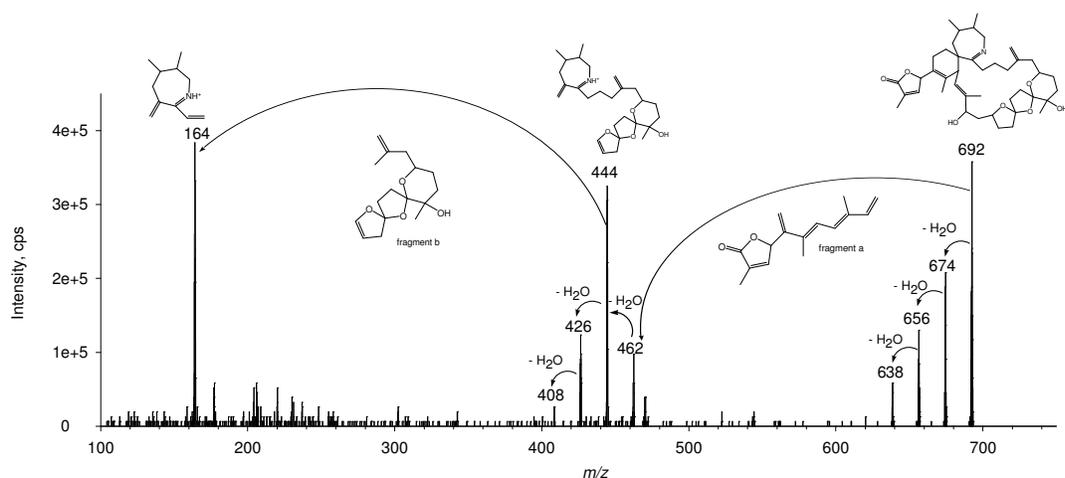
Infatti, esperimenti *full scan* MS¹ preliminari, ottenuti su uno standard di spirolide 13-desmetil C disponibile in commercio, mostravano l'esclusiva formazione, dello ione pseudo-molecolare $[M+H]^+$ a *m/z* 692.5 nelle condizioni di _____ ionizzazione _____ utilizzate.



Spettro full scan MS a ioni positivi dello spirolide 13-desmetil C

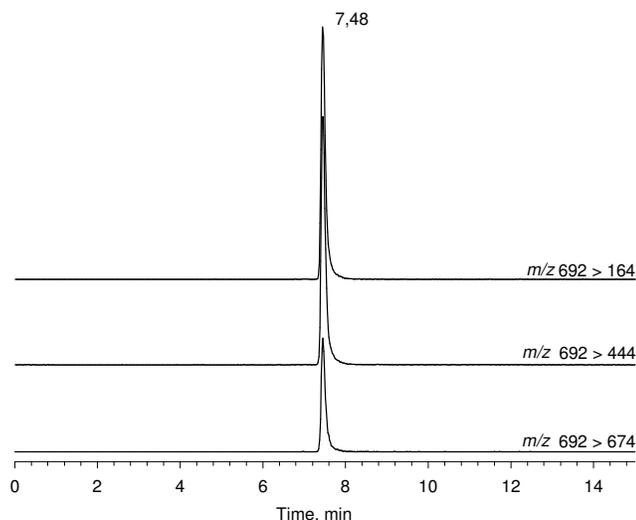
Gli spettri SIM dell'estratto grezzo di *A. ostenfeldii* hanno mostrato la presenza di un picco cromatografico dominante che eluiva a tempo di ritenzione di 7.48 min a m/z 692.5. Tale picco poteva essere assegnato allo spirolide13-desMeC, sulla base del confronto del tempo di ritenzione e del MW con quelli di un campione di 13-desMeC standard.

Per confermare ulteriormente il dato ottenuto abbiamo anche impiegato, come campione di riferimento, un estratto di *A. ostenfeldii* fornito dall' Institute for Marine Biosciences (IMB), Canada, che conteneva, oltre allo spirolide 13-desMeC, anche gli spirolidi C, C3, D, e il 13-desMeD¹⁷. I risultati dello spettro SIM relativi al campione di plankton, hanno fornito ulteriore evidenza della presenza dello spirolide13-desMeC nel ceppo Adriatico di *A. ostenfeldii* e hanno consentito di escludere la presenza degli altri spirolidi prodotti dal ceppo Canadese. La conferma definitiva dell'identità dello spirolide 13-desMeC nel campione Adriatico di *A. ostenfeldii*, è stata ottenuta attraverso esperimenti *Multiple Reaction Monitoring*. Tale esperimento è stato messo a punto sulla base dei risultati degli spettri *full scan* MS/MS registrati utilizzando una soluzione standard di spirolide 13-desMeC, selezionando lo ione $[M+H]^+$ a m/z 692.5 come ione precursore ed una energia di collisione di 53 eV.



Spettro full scan MS/MS a ioni positivi dello spirolide 13-desmetil C

Nello spettro di MS/MS si può notare la presenza di tre caratteristici cluster di ioni frammento i) ioni a m/z 674, 656, e 638 dovuti alle perdite di molecole d'acqua dallo ione pseudo-molecolare; ii) ioni a m/z 462, 444, 426, 408 dovuti alla perdita del "frammento a" strutturale e ad associate perdite d'acqua dallo ione pseudo-molecolare; iii) un abbondante ione a m/z 164 che deriva dallo ione a m/z 444 per perdita del "frammento b" strutturale¹⁵. Gli ioni più abbondanti (m/z 674, 444 e 164) sono stati selezionati come ioni prodotto dello ione a m/z 692 in transizioni MRM. I tracciati MRM dell'estratto grezzo di *A. ostenfeldii* per le tre transizioni diagnostiche (m/z 692 > 674, 692 > 444, e 692 > 164) mostravano la presenza di picchi che eluivano a 7.48 min; Le intensità relative osservate erano identiche a quelle ottenute nelle analisi MRM della soluzione standard dello spirolide 13-desMeC. L'insieme di tutti gli esperimenti effettuati affermavano con chiarezza la presenza dello spirolide 13-desMeC nel campione analizzato.



Spettro MRM a ioni positivi dello spiroside 13-desmetil-C

L'analisi quantitativa è stata condotta mediante il confronto dell'area del picco della transizione più abbondante a m/z 692 > 164 con quella ottenuta iniettando una soluzione dello spiroside13-desMeC standard a livello di concentrazione paragonabile, nelle stesse condizioni sperimentali. Il livello di concentrazione per lo spiroside 13-desMeC riscontrato è stato di 3.7 pg cell^{-1} .

Nelle stesse condizioni di ionizzazione e frammentazione ottimizzate per lo spiroside 13-desMeC, sono stati effettuati una serie di esperimenti MRM selezionando transizioni caratteristiche per gli spiroside noti A, B, C, 13-desMeC, D e 13-desMeD i cui risultati hanno definitivamente escluso la presenza di tali composti nell'estratto grezzo.

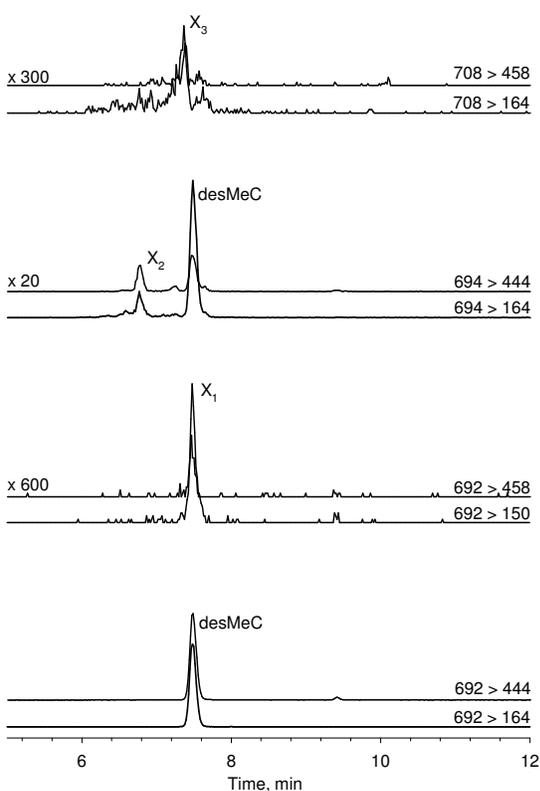
Solitamente nella maggior parte dei ceppi di *A. ostensfeldii* analizzati, il derivato13-desMeC rappresenta il componente principale, che costituisce di solito il 90% del contenuto totale di spiroside¹⁵. Per tale ragione, poiché tale tossina era presente nell'estratto grezzo in concentrazione relativamente basse, è

nato il sospetto legato ad un possibile effetto di soppressione della matrice che poteva aver impedito la rivelazione di ulteriori spiroolidi presenti in quantità minore. A questo punto è stato effettuato un clean-up attraverso estrazione in fase solida (SPE). L'SPE è stata effettuata utilizzando una fase stazionaria C18 eluita con soluzioni di acqua/acetonitrile a polarità decrescente. Tutti gli eluati dell'SPE sono stati analizzati all'LC-MS in modalità MRM a ioni positivi secondo questa logica: gli ioni protonati relativi agli spiroolidi A e 13-desMeC (m/z 692), B e 13-desMeD (m/z 694), C (m/z 706), e D (m/z 708) sono stati selezionati come ioni precursori e combinati con i quattro possibili ioni frammento a m/z 150, 164, 444, e 458. Queste transizioni sono state monitorate in quattro esperimenti MRM utilizzando 250 msec come dwell time in modo da rendere maggiore la sensibilità di rivelazione.

Tali esperimenti hanno permesso di indagare nuovamente sulla presenza dei derivati noti già ricercati ma soprattutto hanno messo in evidenza alcuni analoghi non noti che differiscono per la sostituzione nella parte strutturale dando origine al “frammento a” e “frammento b” visibili nello spettro di MS/MS del 13-desMeC, precedentemente mostrato.

I risultati delle analisi MRM dell'eluato dell'SPE acetonitrile/acqua (1:1) sono mostrate nella figura seguente. Tali dati suggerivano la presenza di tre nuovi analoghi (X1, X2 e X3) nell'estratto di *A. ostenfeldii*. In particolar modo, due di questi (X2 e X3) presentano lo stesso pattern di frammentazione rispettivamente dello spirolide 13-desMeD (m/z 694 > 164 e 694 > 444) e D (m/z 708 > 164 e 708 > 458), ma notevole differenza nei tempi di ritenzione, nello specifico $R_t(X2) = 6.77$ min contro $R_t(13\text{-desMeD}) = 8.84$ min e $R_t(X3) = 7.36$ min contro $R_t(D) = 7.79$ min. Al contrario, X1 presenta lo stesso tempo di

ritenzione dello spiroside 13-desMeC (7.50 min) ma diverse frammentazioni (m/z 692 > 150 and 692 > 458), suggerendo che si tratta di un nuovo derivato verosimilmente con $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, ed un gruppo metilico addizionale all'interno della porzione della molecola "frammento b". Il comportamento di X1, X2 e X3 riscontrato negli spettri di massa chiaramente riconduce a strutture di tipo spiroside-simili. Sfortunatamente la quantità esigua di materiale a nostra disposizione ha impedito la completa elucidazione strutturale.



Conclusioni

Questo lavoro mette in luce, per la prima volta, la presenza del dinoflagellato tossico *Alexandrium ostenfeldii* nel Mar Adriatico. L'attenta ed accurata analisi LC-MS della coltura di questo organismo rivela che il ceppo Adriatico di *A. ostenfeldii* produce spirolidi ma non PSP tossine, che sono invece prodotte dai ceppi della Nuova Zelanda e della Scandinavia^{11,6}. E' interessante notare che, l'*A. ostenfeldii* dell'Adriatico oltre allo spirolide 13-desMeC produce alcuni isomeri di spirolidi non noti. Inoltre questa rappresenta la prima volta in cui tossine ad azione rapida del tipo "spirolide" sono rinvenute nel Mar Adriatico. La diversità degli spirolidi isomeri rivelati può essere spiegata sulla base della classica via biogenetica dei polichetidi a cui partecipano unità di acetato e propinato, che può verificarsi con un differente ordine di sequenze accoppiate acetato/propinato.

Gli obiettivi della ricerca futura sono: i) verificare se gli spirolidi sono accumulate in mitili coltivati nel Mar Adriatico; ii) colture in larga scala di *A. ostenfeldii* con lo scopo di isolare sufficienti quantitativi dei nuovi derivati in modo da portare a termine l'elucidazione strutturale avvalendoci di tecniche NMR e di MS/MS.

3.4.2 Parte sperimentale

Retinata e Coltura cellulare di *A. ostenfeldii* (Paulsen) Balech and Tangen. La specie *Alexandrium ostenfeldii* oggetto di questo studio, è stata isolata nel novembre 2003 a partire da campioni raccolti, dai ricercatori del Centro Ricerche Marine di Cesenatico (CRM), in un'area localizzata

nell'Adriatico Nord Occidentale lungo la costa dell'Emilia Romagna. Questi campionamenti vengono svolti periodicamente dal 1978 nell'ambito di un piano di monitoraggio del fitoplancton tossico per il controllo degli allevamenti di mitili .

Le analisi quali-quantitative del fitoplancton nei campioni naturali sono state effettuate attraverso il metodo di Utermöhl¹⁸, su campioni di acqua fissati e conservati in bottiglie di vetro scure.

Alexandrium ostenfeldii è stato isolato a partire da campioni freschi di acqua di mare attraverso il metodo della micropipetta¹⁹; dopo una crescita iniziale in micropiastre, sono state allestite delle colture unialgali in beute sterili chiuse con tappi di cotone che permettono gli scambi gassosi utilizzando un terreno F/2 di Guillard and Ryther²⁰ ad una salinità di 30 psu. Le colture sono state fatte crescere in camera termostatica ad una temperatura di 20°C con un ciclo luce-buio di 16-8 ore; l'intensità luminosa era di circa 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Per le analisi di tossicità *Alexandrium ostenfeldii* è stato fatto crescere in un volume maggiore utilizzando due beute contenenti ciascuna 1500 ml di terreno di coltura; le alghe sono state raccolte in fase stazionaria avanzata di crescita al 30th giorno. La raccolta è stata effettuata in due fasi: all'inizio le alghe sono state concentrate attraverso filtrazione blanda su filtri 0,45 μm Millipore per evitare la rottura delle cellule e potere valutare in maniera corretta il contenuto di tossine nelle cellule e nel *medium*; la sospensione algale concentrata (10-15 ml) è stata successivamente centrifugata a 3000 g per 15 minuti a 10°C. Il pellet algale e i terreni di coltura sono stati congelati e conservati a -20°C per le analisi del contenuto di tossine. Il numero di cellule su cui sono state

determinate le tossine è stato valutato attraverso il conteggio secondo il metodo di Utermöhl¹⁸ in un subcampione al momento della raccolta.

Estrazione e clean-up dei campioni cellulari. Le cellule coltivate presso i laboratori dell'Università di Bologna (49×10^6 cellule in 3 l di coltura) sono state sospese in 9 ml di soluzione metanolo/acqua (8:2, v/v) e sonicate per 5 min con l'ausilio di un bagno di ghiaccio. La sospensione è stata centrifugata a 5000 rpm per 10 min ed il pellet cellulare è stato estratto altre due volte con 9 ml di metanolo. I surnatanti sono stati riuniti ed il volume portato a 27 ml con il solvente di estrazione. Un'aliquota di 1 ml dell'estratto grezzo è stato direttamente analizzato attraverso LC-MS iniettando 5 μ l. Un'aliquota di 6 ml di estratto è stata evaporata ed il residuo ridisciolti in 1 ml di una soluzione acetonitrile-acqua (1:9, v/v). Tale soluzione è stata caricata su di una Sep-Pak C-18 plus cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA), precedentemente equilibrata con la stessa soluzione. La colonnina è stata sequenzialmente eluita con 10 ml di soluzioni di acetonitrile-acqua (1:9, 3:7, 1:1, v/v). Ciascun eluato è stato evaporato, ridisciolti in 1 ml di metanolo ed iniettato direttamente nel sistema LC-MS.

Analisi LC-MS. Tutti gli esperimenti di massa sono stati realizzati su uno spettrometro di massa con sorgente di ionizzazione turbo-ionspray ed analizzatore a triplo quadrupolo API 2000 (Applied, Thornhill, ON, Canada), accoppiato ad un sistema HPLC Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) che include serbatoio per i solventi, degasatore, pompa binaria e autocampionatore refrigerato. Le analisi LC-MS per gli spiroliidi¹⁶, sono state effettuate impiegando una colonna 3 μ m Hypersil C8 BDS, 50 \times 2.00 mm (Phenomenex,

Torrance, CA, USA) mantenuta a temperatura ambiente. L'eluizione della colonna è stata effettuata sia in gradiente (dal 10 al 100% B in 10 min, e poi 100% B per 15 min) che in isocratica al 65% di B dove A=H₂O e B= 95% acetonitrile/H₂O entrambi gli eluenti contenenti il tampone 2 mM ammonio formiato e 50 mM acido formico. Il flusso impiegato è di 200 µl min⁻¹. Gli esperimenti *Selected Ion Monitoring* (SIM) sono stati condotti in modalità a ioni positivi selezionando, per gli spiroolidi noti, gli ioni qui riportati:

| Spirolide | [M+H]⁺ (m/z) | Transizioni Q1 > Q3 (m/z > m/z) | |
|------------------|--------------------------------|--|-------------|
| A | 692.5 | 692.5 > 150 | 692.5 > 444 |
| B | 694.5 | 694.5 > 150 | 694.5 > 444 |
| C | 706.5 | 706.5 > 164 | 706.5 > 458 |
| 13-desM-C | 692.5 | 692.5 > 164 | 692.5 > 444 |
| D | 708.5 | 708.5 > 164 | 708.5 > 458 |
| 13-desM-D | 694.5 | 694.5 > 164 | 694.5 > 444 |
| E | 710.5 | | |
| F | 712.5 | | |

Generalmente è stato usato un dwell time di 100 msec e sono stati monitorati un massimo di 10 ioni per ciascun esperimento.

Sono stati condotti quattro tipi di esperimenti MRM selezionando i seguenti gruppi di transizioni (692 > 150, 692 > 164, 692 > 444, 692 > 458), (694 > 150, 694 > 164, 694 > 444, 694 > 458), (706 > 150, 706 > 164, 706 > 444, 706 > 458) e (708 > 150, 708 > 164, 708 > 444, 708 > 458). Per ciascuna

transizione il dwell time impiegato è stato di 250 msec. Sono stati usati valori di temperatura di 100 °C, un ionspray voltage di 5400 V, un declustering potential di 90 V, un focusing potential di 230 V, ed un entrance potential di 12 V. Negli esperimenti MRM è stata utilizzata una energia di collisione di 53 eV ed un potenziale in uscita dalla cella di collisione di 13 V. Lo Spirolide 13-desMeC è stato quantificato nell'estratto crudo per confronto diretto con una soluzione standard dello Spirolide 13-desMeC a concentrazione simile, iniettato nelle stesse condizioni sperimentali.

Le analisi HILIC-MS per le PSP tossine¹³ sono state effettuate utilizzando una colonna 5 μ m TSK-GEL Amide-80 250 \times 2.00 mm (Tosohaas PA, USA) a temperatura ambiente. L'eluente A=H₂O e B= 95% acetonitrile entrambi contenenti un tampone 2mM ammonio formiato e 3.6 mM acido formico (pH 3.5). E' stata effettuata un'eluizione isocratica al 65% B a flusso di 200 μ l min⁻¹. Sono state effettuate iniezioni da 5 μ l. Gli esperimenti *Selected Ion Monitoring* (SIM) e *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) sono stati condotti in modalità positiva. In modalità SIM sono stati monitorati i seguenti ioni: m/z 300 per saxitossina (STX) e gonyautossina 5 (GTX5), m/z 316 per la neosaxitossina (NEO), gonyautossine 2/3 (GTX2/3) e *N*-sulfogonyautossine 1/2 (C1/2), m/z 380 per GTX5, m/z 396 per GTX2/3 e C1/2, m/z 412 e 332 sia per gonyautossine 1/4 (GTX1/4) che *N*-sulfogonyautossine 3/4 (C3/4). In modalità MRM sono state monitorate le seguenti transizioni (ione precursore) > (ione frammento): m/z 300 > 282 per STX, m/z 316 > 298 per NEO, m/z 380 > 300 per GTX5, m/z 396 > 316 e 396 > 298 sia per GTX2/3 che C1/2, m/z 412 > 332 e 412 > 314 sia per GTX1/4 che C3/4. In tali esperimenti sono stati usati per ciascuno ione o transizione dei dwell time di 150 msec, una temperatura di

50°C, un ionspray voltage di 4500 V, un declustering potential di 55 V, un focusing potential di 270 V, un entrance potential di 5 V, una collision energy di 25 eV e un cell exit potential di 7 V.

3.4.3 Riferimenti bibliografici

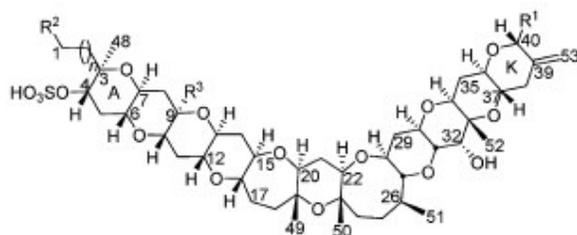
1. Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W. M., Wright, J. L. C., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1995**, 20, p. 2159.
2. Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M. A., in: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Bolch, C. J., Lewis, R. J., **2000**: (Eds.), *Harmful Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, p. 383.
3. Hu, T., Burton, I. W., Cembella, A. D., Curtis, J. M., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Wright, J. L. C., *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64(3), p. 308.
4. Hu, T., Curtis, J. M., Walter, J. A., Wright, J. L. C., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37(43), p. 7671.
5. Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M. A., *Natural Toxins*, **1999**, 7(5), p.197.
6. Cembella, A. D., Quilliam, M. A., Lewis, N. I., *Phycologia*, **2000**, 39, p. 67.
7. Cembella, A. D., Bauder, A. G., Lewis, N. I., Quilliam, M. A., *J. Plank. Res.* **2001**, 23(12), p.1413.
8. Moestrup O., Hansen P.J., *Ophelia*, **1988**, 28(3), p.195.
9. Aasen, J., MacKinnon, S. L., LeBlanc, P., Walter, J. A., Hovgaard, P., Aune, T., Quilliam, M. A., *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18(3), p. 509.

10. John, U., Cembella, A. D., Hummert, C., Elbrächter, M., Groben, R., Medlin, L. K.,. *Eur. J. Phycol.* **2003**, 38, 25–40.
11. Mackenzie, L., White, D., Oshima, Y., Kapa, J.,. *Phycologia*, **1996**, 35(2), p.148.
12. Balech, E., Tangen, K., **1985**. comb comb. nov. *Sarsia* 70, p.333.
13. Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam MA, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1081, p.190.
14. Ravn, H., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P. H., Oshima, Y., *J. Appl. Phycol*, **1995**, 7(6), p.589.
15. Sleno, L., Windust, A. J., Volmer, D. A.,. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004a** 378(4), p. 969. Sleno, L., Chalmers, M. J., Volmer, D. A.,. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004b**, 378(4), p. 977.
16. Quilliam, M. A., Hess, P., Dell'Aversano, C.,. In: deKoe, W. J., Sampson, R. A., van Egmond, H. P., Gilbert J., Sabino, M. (Eds), *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the turn of the Millenium*, de Koe, W. J., **2001**, Wageningen, The Neatherlands, p. 383.
17. Maclean, C., Cembella, A. D., Quilliam, M. A., *Botanica Marina*, **2003**, 46(5), p.466.
18. Utermöhl, H.,. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.*, **1931**, 5, p. 567.
19. Hoshaw R.W, Rosowski J. R., 1973 In: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, New York, p.53.
20. Guillard, R. R. L., Ryther, J. H., *Can. J. Microbiol.*,**1962**, 8, p. 229.

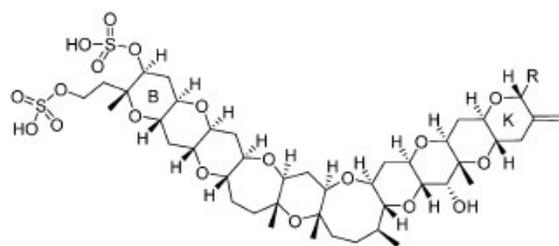
3.5 Effetto della salinità sulla crescita, produzione e rilascio di yessotossina in *Protoceratium reticulatum*

La sindrome DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) da biotossine algali è la più diffusa in Italia dove, lungo le coste dell'Adriatico settentrionale, causa seri problemi economici, sociali e sanitari legati all'importanza dell'area nella produzione di molluschi eduli. Sulla base del saggio biologico sul topo, fra le varie classi di tossine comprese nel gruppo DSP, ritroviamo la famiglia delle yessotossine (YTXs), la cui tossicità sull'uomo è tuttora controversa. A questo proposito è di primaria necessità isolare, in forma pura, il maggior quantitativo possibile di yessotossina (YTX) da impiegare in studi farmacologici.

La scoperta di alte concentrazioni di YTXs nei molluschi eduli dell'Adriatico risale al 1995¹, osservazioni sul fitoplancton e analisi su colture hanno successivamente dimostrato che la loro origine biogenica è attribuibile al dinoflagellato *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann) Buetschli (= *Gonyaulax grindley* Reinecke)². Infatti proprio presso i nostri laboratori, da ceppi di *P. reticulatum* isolati nel Nord Adriatico, oltre alla YTX sono stati evidenziati anche analoghi come la omoYTX, la 45-OHYTX, la carbossiYTX e la noroxoYTX, che si ritrovano normalmente nei molluschi³. Recentemente, da ceppi neozelandesi di *P. reticulatum*, sono stati identificati una serie di nuovi analoghi della YTX che rendono così il profilo tossicologico di *P. reticulatum* ancor più complesso⁴.

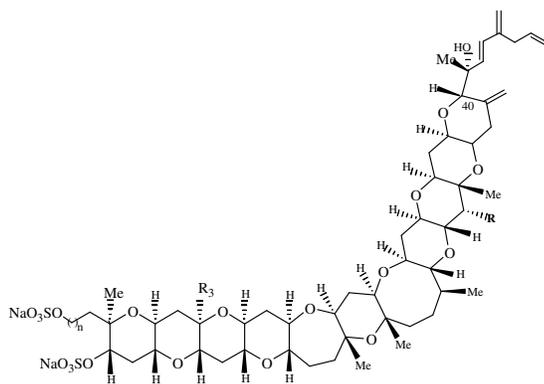


| | R ¹ | R ² | R ³ | <i>n</i> | <i>m/z</i> |
|------------------------------|----------------|--------------------|-----------------|----------|------------|
| 44,55-diOHYTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1175 |
| 44,55-diOH-41a-homo YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1189 |
| 44,55-diOH-9-Me-41a-homo YTX | | HO ₃ SO | CH ₃ | 1 | 1203 |
| YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1141 |
| 1a-homo YTX | | HO ₃ SO | H | 2 | 1155 |
| trinor YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1101 |
| 45-OHYTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1157 |
| 45-OH-1a-homo YTX | | HO ₃ SO | H | 2 | 1171 |
| carboxy YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1173 |
| carboxy-1a-homo YTX | | HO ₃ SO | H | 2 | 1187 |
| heptanor-41-oxo YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1047 |
| heptanor-41-oxo-1a-homo YTX | | HO ₃ SO | H | 2 | 1061 |
| 1-desulfo YTX | | HO | H | 1 | 1061 |
| 41a-homo YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1155 |
| 9-Me-41a-homo YTX | | HO ₃ SO | CH ₃ | 1 | 1169 |
| | | HO ₃ SO | H | 1 | 1290 |
| | | HO ₃ SO | CH ₃ | 1 | 1304 |
| 55-nor-43-oxo YTX | | HO ₃ SO | H | 1 | 1143 |



| R | m/z |
|---|------|
| | 991 |
| | 1085 |

Alla famiglia delle YTXs si annoverano anche composti glicosilati:



| n | Tossina | R | [M-2Na+H] ⁺ |
|---|---------------------------|---|------------------------|
| 1 | GlycoYTXA | | 1273 |
| 2 | 1a-omo YTX arabinoside | | 1287 |
| 2 | 1a-omo YTX diarabinoside | | 1419 |
| 2 | 1a-omo YTX triarabinoside | | 1551 |

Il numero elevato e la varietà strutturale delle tossine appartenente a questa classe, conferma pienamente l'evidenza di laboratorio, relativa ad altre specie fitoplanctoniche, che mostra un'elevata variabilità nella produzione di tossine tra ceppi diversi della stessa specie lasciati crescere nelle medesime condizioni, e nello stesso ceppo cresciuto in condizioni diverse. Infatti la capacità di produrre tossine è probabilmente geneticamente predefinita ma anche influenzata da condizioni ambientali.

Il contenuto cellulare di tossina sembra essere correlato alla fase di crescita e/o a fattori abiotici ambientali esterni, come temperatura, luce e disponibilità dei nutrienti, ma le risposte alle diverse combinazioni di questi effetti sono difficilmente prevedibili. Tuttavia, si può affermare che gli stress da nutrienti, sembrano uno dei fattori più importanti coinvolti nella regolazione della produzione/concentrazione delle tossine nel fitoplancton infatti la concentrazione delle tossine può aumentare in seguito a "upshock"(somministrazione di nutrienti dopo la carenza) o a "downshock" (carenza di nutrienti) a seconda dei casi. Da non trascurare è l'influenza che può esercitare la salinità sulla produzione delle tossine. Questo parametro infatti presenta un'accentuata variabilità nelle acque superficiali soprattutto costiere, strettamente correlata ai regimi di portata fluviale. Anche l'azione di mescolamento, operata dal moto ondoso, e da situazioni idrodinamiche particolari, quali processi di upwelling (che inducono il trasporto in costa di acque profonde ad elevata salinità) determina fluttuazioni di questo parametro.

Quest'importante fattore fisico sembra influenzare la produzione di tossine, in quanto la salinità agisce sullo scambio di ioni tra la cellula e l'ambiente esterno, più precisamente sui meccanismi di trasporto dei nutrienti.

La salinità può interferire con l'osmoregolazione e questo può avere effetto sulla biosintesi degli amminoacidi.

A questo proposito un'ulteriore aspetto del mio lavoro ha riguardato l'analisi quali-quantitativa della produzione di YTX da colture di *P. reticulatum* cresciute in diverse condizioni di salinità; tenendo in considerazione sia la quota di tossina presente nei pellet cellulari, che quella rilasciata nel terreno di coltura. Inoltre il secondo obiettivo, è stato quello di isolare la quantità maggiore possibile di YTX in forma pura, da impiegare in studi farmacologico.

3.5.1 Risultati

Le analisi LC-MS effettuate sui vari ceppi di *P. reticulatum* isolati negli ultimi 5 anni hanno messo in evidenza che questa specie è in grado di sintetizzare, oltre alle molecole precedentemente descritte³, anche la carbossiomoYTX, la 45-OH omoYTX, e un numero ancora imprecisato di nuovi derivati. Questi dati rappresentano una ulteriore conferma che molti degli analoghi strutturali identificati negli estratti dei molluschi tossici, non derivano da cambiamenti metabolici che avvengono in questi organismi ma sono anch'essi prodotti dalle alghe. In particolare ci sono state fornite dal laboratorio di Algologia di Scienze Ambientali di Ravenna 4 colture di *P. reticulatum* cresciute in differenti condizioni di salinità:

Salinità 22‰: Mezzo di coltura raccolto in fase stazionaria di crescita, 3 litri
Pellet cellulare, n° di cellule totali 21733000

Salinità 27‰: Mezzo di coltura raccolto in fase stazionaria di crescita, 3 litri
Pellet cellulare, n° di cellule totali 22559000

Salinità 32‰: Mezzo di coltura raccolto in fase stazionaria di crescita, 3 litri
Pellet cellulare, n° di cellule totali 28488000

Salinità 37‰: Mezzo di coltura raccolto in fase stazionaria di crescita, 3 litri
Pellet cellulare, n° di cellule totali 30410000.

Salinità 42‰: Mezzo di coltura raccolto in fase stazionaria di crescita, 3 litri
Pellet cellulare, n° di cellule totali 30470000.

Per ciascun campione i pellet algali sono stati estratti tramite sonicazione con metanolo. I mezzi di coltura sono stati sottoposti ad estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction, SPE*) su cartuccia C 18, in modo da concentrare le biotossine in un unico eluato costituito da propanolo/acqua 2:8. Sia gli estratti cellulari grezzi che gli eluati derivanti dall'SPE, di ogni campione, sono stati sottoposti ad analisi LC-MS impiegando il metodo RPLC-MS, messo a punto presso i nostri laboratori negli scorsi anni⁵, applicando qualche modifica al tampone addizionato alla fase mobile in modo da incrementare ulteriormente la ionizzazione delle YTXs.

Abbiamo effettuato inizialmente un'analisi qualitativa preliminare su tutti gli estratti dei pellet cellulari e dei mezzi di coltura, operando in modalità SIM a ioni negativi, monitorando gli ioni pseudo-molecolari relativi alle principali YTXs insieme agli ioni relativi alla classica perdita della funzione solfato nella porzione occidentale della molecola per ciascuna molecola indagata.

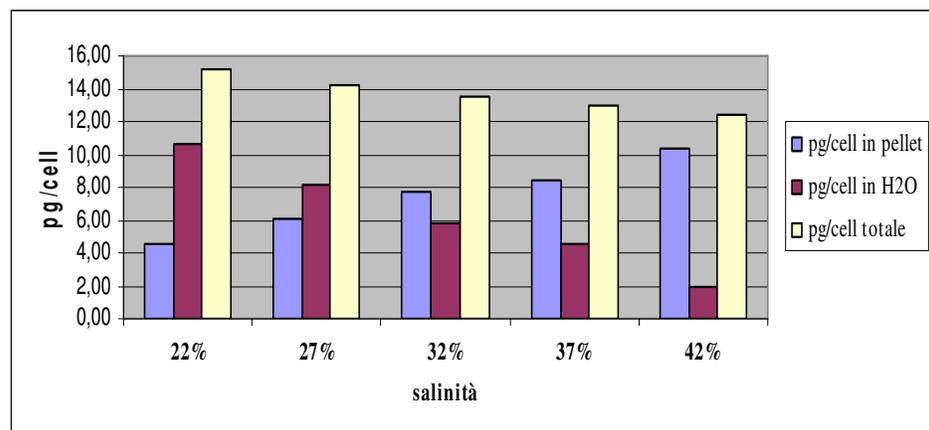
| Tossina | [M-2Na+H]⁻ | [M-SO₃-2Na+H]⁻ |
|-----------------------|------------------------------|---|
| YTX | 1141.1 | 1061.1 |
| OmoYTX | 1155.1 | 1075.1 |
| NoroxoYTX | 1047.1 | 967.1 |
| CarbossiYTX | 1173.1 | 1093.1 |
| Carbossi-omoYTX | 1187.1 | 1107.1 |
| 45-OHYTX | 1157.1 | 1077.1 |
| 45-OHomoYTX | 1171.1 | 1091.1 |
| 44,55-diOH-41a-omoYTX | 1189.1 | 1109.1 |
| glicoYTXA | 1273.1 | 1193.1 |
| 44,55-diOH-YTX | 1175.1 | 1095.1 |

I tracciati SIM hanno confermato la presenza di più di un picco cromatografico che eluivano a tempi di ritenzione differenti, per alcuni degli ioni monitorati, ciò evidenzia la presenza di composti isobari, possibili isomeri delle tossine note. Inoltre, per la sola YTX, al fine di effettuare un'analisi quantitativa più accurata e come ulteriore conferma, abbiamo ripetuto le analisi su tutti i campioni, in modalità MRM a ioni negativi, monitorando la transizione Q1 > Q3 m/z 1141 > 1061, relativa alla perdita di 80 unità di massa dallo ione precursore, corrispondente alla perdita di uno dei due gruppi solfato nella porzione occidentale della molecola. L'analisi quantitativa della YTX è avvenuta, per ciascun campione analizzato, mediante confronto diretto con una soluzione standard di YTX a concentrazione paragonabile, iniettata in modalità MRM nelle stesse condizioni sperimentali, i risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

| Salinità | YTX (cellulare) pg/cell | YTX (medium) pg/cell | YTX (totale) pg/cell | % YTX pellet | % YTX medium |
|----------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| 22‰ | 4,60 | 10,60 | 15,20 | 30,26 | 69,74 |
| 27‰ | 6,10 | 8,10 | 14,20 | 42,96 | 57,04 |
| 32‰ | 7,75 | 5,80 | 13,55 | 57,20 | 42,80 |
| 37‰ | 8,48 | 4,49 | 12,97 | 65,38 | 34,62 |
| 42‰ | 10,38 | 1,97 | 12,36 | 84,03 | 15,97 |

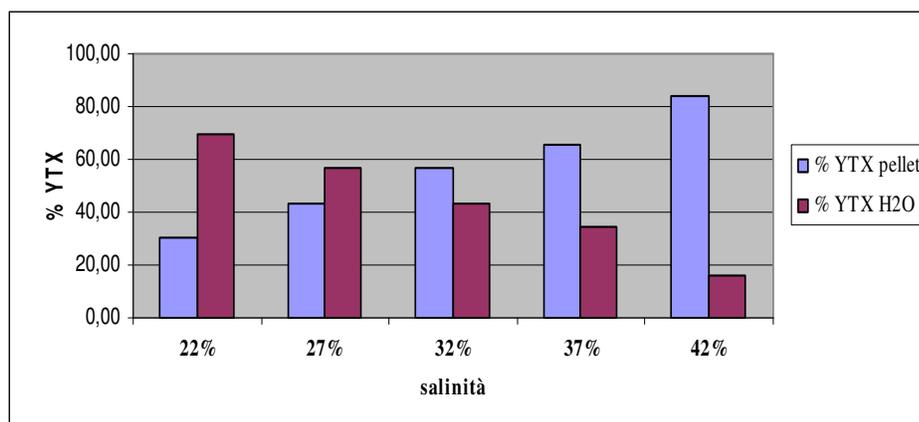
Produzione e rilascio di YTX (pg/cell) da parte di P. reticulatum in diverse condizioni di salinità del terreno di coltura.

Le variazioni di salinità dal 22 al 37‰ hanno un effetto modesto sulla crescita e sul volume cellulare di *P. reticulatum* che, essendo una specie neritica ed eurialina sembra adattarsi molto bene ai cambiamenti. Dai dati ottenuti emerge che la crescita in differenti condizioni di salinità sembra influenzare in maniera non eccessiva la produzione totale (cellule + terreno di coltura) di YTX per cellula.



Ciò che invece risulta particolarmente interessante da un punto di vista ecologico, è che il *P. reticulatum*, è in grado di rilasciare attivamente tossine nell'ambiente e la quantità di YTX, che viene rilasciata nel terreno di coltura varia dal 70 al 16 % diminuendo progressivamente all'aumentare della salinità.

Di conseguenza i valori più alti di tossina nelle cellule, si riscontrano alle salinità maggiori, come si può notare dal grafico seguente.



A questo punto, con a disposizione estratti di pellet cellulari e di terreni di coltura, ho ritenuto opportuno trarre da questo materiale, il quantitativo maggiore possibile di YTX pura in modo da contribuire agli studi farmacologici, tesi ad identificare in maniera specifica il meccanismo d'azione di tale classe di tossine.

La riunione di tutti gli estratti ottenuti è stata sottoposta a purificazione cromatografica su colonna a fase inversa ed eluita con solventi a polarità decrescente adattando alle nostre esigenze la metodica proposta da Goto *et al*⁶ per la purificazione di piccoli volumi di estratti di mitili contenenti yessotossine. A tale metodo sono però state apportate alcune modifiche: i) nella fase iniziale della procedura è stato usato un tampone formiato invece di un

tampone fosfato, incompatibile con l'analisi LC MS che sarebbe stata poi necessaria per quantificare la YTX ottenuta; ii) nella fase finale, all'eluizione con propanolo/acqua (2:8), è seguito uno step di eluizione con metanolo 100% per consentire la raccolta anche dei componenti più lipofili dell'estratto. L'analisi di ciascuna frazione mediante ¹H-NMR ha permesso di identificare, nell'eluato propanolo/H₂O, la presenza di YTX tramite confronto dei valori di *chemical shift* riportati in letteratura per il composto in questione. Abbiamo quindi effettuato una ulteriore purificazione di questa frazione su colonna HPLC a fase inversa preparativa con rivelazione UV alla λ di 230 nm, eluendo in isocratica con una miscela costituita da metanolo/acetonitrile/acqua. Lo spettro ¹H-NMR delle frazioni ottenute, ci ha permesso di individuare nuovamente la frazione in cui la tossina si era concentrata. Questa frazione è stata cromatografata nuovamente su colonna HPLC analitica con rivelazione UV alla λ di 230 nm impiegando la stessa fase mobile utilizzata nello step precedente. Una delle frazioni ottenute mostrava l'esclusiva presenza della YTX nello spettro ¹H-NMR. L'analisi quantitativa della YTX purificata è avvenuta tramite LC-MS in modalità SIM a ioni negativi, per confronto diretto con uno standard di YTX, a concentrazione nota iniettato nelle medesime condizioni sperimentali. E' stata rivelata una quantità pari ad 1 mg di YTX.

3.5.2 Parte sperimentale

Colture. Vari ceppi di *Protocerotium reticulatum* sono stati isolati negli ultimi 5 anni da campioni di acqua provenienti dalla costa emiliano-romagnola e mantenuti in coltura in *medium* f/10 sterile (*f/2 medium*, diluito 5 volte), al

30‰, a 20°C con un ciclo luce/buio di 16:8h. Le prove sono state condotte allestendo colture batch in triplicato a condizioni di salinità rispettivamente del 22, 27, 32, 37 e 42 ‰; le alghe sono state raccolte in fase di crescita stazionaria, per filtrazione (0,45 µm) per gravità in modo da non rompere le cellule, causando la fuoriuscita delle tossine nel medium .

Estrazione del pellet e del *medium* Ciascun pellet cellulare è stato sonicato in metanolo (6 ml) per 5 minuti con l'ausilio di un bagno di ghiaccio.

La miscela ottenuta è stata centrifugata a 3.000 rpm per 15 minuti ed il pellet è stato lavato per 2 volte con 6 ml. di metanolo. I supernatanti raccolti sono stati riuniti ed il volume aggiustato a 18 ml con il solvente di estrazione. Un'aliquota pari ad 1 ml è stato prelevato per l'analisi LC-MS.

I mezzi di cultura sono stati concentrati su SPE (*Solid Phase Extraction*). In particolare il pH di ogni mezzo di coltura è stato prima portato a 5.8 con una soluzione di acido formico 1% e successivamente caricato su cartuccia Sep-Pak C-18 plus (Waters Corporation, Milford, MA, USA) precedentemente ambientata con acqua allo stesso pH.

La colonna è stata eluita con 10 ml di una miscela propanolo-H₂O (2 : 8, v/v) e 10ml di MeOH 100%. I due eluati ottenuti per ciascun campione sono stati riuniti ed evaporati sotto vuoto. Il residuo ottenuto è stato ridisciolti in 10 ml di metanolo ed analizzato direttamente in LC-MS.

Clean-up Tutti gli estratti sia dei pellet che dei terreni di coltura di ciascun campione di *P. reticulatum* a nostra disposizione, sono stati riuniti e cromatografati su colonna RP 18 usando il seguente sistema di eluizione: i) 300 ml di una soluzione 20 mM tampone formiato (pH 5.8)/metanolo (7:3); iii) 300

ml di una soluzione metanolo/acqua (3:7); iv) 300 ml di una soluzione propanolo/acqua (2:8); v) 300 ml di metanolo 100%. Le YTXs erano contenute nella frazione eluita con propanolo/acqua (2:8) che è stata purificata prima per HPLC preparativa (10) μm e poi analitica (5 μm) utilizzando in entrambi i casi una fase stazionaria C18 eluita con una miscela $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:2:2, rivelando l'eluizione delle tossine con un rivelatore UV a λ 230 nm. Sono stati così ottenuti 1 mg di YTX, identificata per confronto delle sue proprietà spettroscopiche con i dati riportati in letteratura.

LC-MS. I dati all' LC-MS sono stati acquisiti sia sulle cellule che sui terreni di coltura opportunamente estratti utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 2000 (Applied Biosystems) dotato di sorgente turbo ion spray e accoppiato ad un sistema HPLC Agilent HP 1100. E' stata utilizzata una colonna Hypersil C8 BDS, 50x2 mm, 3 μm (Phenomenex, CA, USA) ed una fase mobile costituita da: A= H_2O 2 mM formiato d'ammonio B= 95% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 2 mM formiato d'ammonio; l'eluizione è stata effettuata secondo un gradiente (10-100% B in 10 min; 100% B per 15 min).

Le iniezioni sono state di 5 μl in tutti i casi. La modalità di acquisizione per l'analisi qualitativa iniziale è stato l'esperimento SIM a ioni negativi in cui sono stati monitorati i seguenti ioni a m/z : 1141.1 (YTX), 1061.1(YTX- SO_3), 1155.1(omoYTX), 1075.1 (omoYTX- SO_3), 1047.1 (noroxoYTX), 967.1 (noroxoYTX- SO_3), 1173.1 (carbossiYTX), 1093.1 (carbossiYTX- SO_3), 1187.1 (carbossiomoYTX), 1107.1 (carbossiomoYTX- SO_3), 1157.1 (45-OHYTX), 1077.1 (45-OHYTX- SO_3), 1171.1(45-OHomoYTX), 1091.1 (45-OHomoYTX- SO_3), 1189.1 (44,55-diOH-41a-omoYTX), 1109.1 (44,55-diOH-41a-omoYTX -

SO₃) , 1273.1 (glicoYTXA), 1193.1 (glicoYTXA-SO₃), 1175.1 (44,55-diOHYTX), 1095.1 (44,55-diOHYTX -SO₃). I dwell time sono stati 100 msec per ciascuno ione. E' stato impiegato uno Ion Spray Voltage (IS) di -4500 V, Declustering Potential (DP) di -100 V, Focusing Potential (FP) di -350 V, Entrance Potential (EP) di -9 V. e una Temperatura della sorgente di 100°C.

Sono stati effettuati inoltre esperimenti MRM a ioni negativi monitorando la transizione relativa alla YTX 1141.1 > 1061,1 con dwell time di 1000 msec. E' stata utilizzata una energia di collisione (CE) pari a -50 eV, un potenziale in uscita dalla cella di collisione (CXP) di -35 Ve un gas di collisione (CAD) pari a 2.

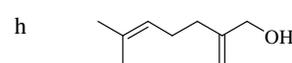
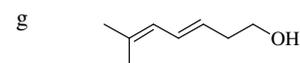
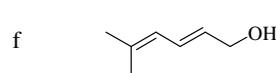
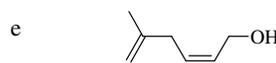
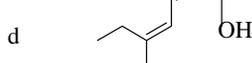
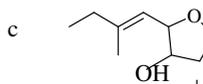
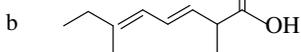
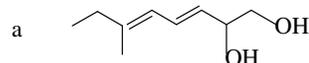
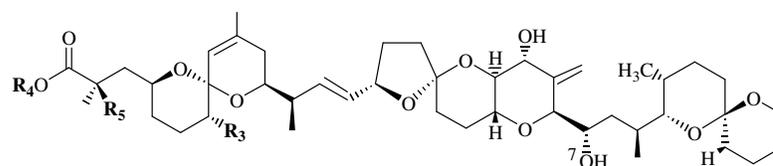
3.5.3 Riferimenti bibliografici

1. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Satake M., Viviani R., Yasumoto T. *Toxicon*, **1997**,35, p. 177.
2. Boni L., Ceredi A., Guerrini F., Milandri A., Pistocchi R., Poletti R., Pompei M. **2002** In: Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J., Lewis R.J. (eds.), *Harmful Algae*. Intergov. Oceanogr. Comm., Paris, p. 137.
3. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Guerrini F., Pistocchi R., Boni L., *Toxicon*, **2003**, 42, p. 7.
4. Finch, S. C.; Wilkins, A. L.; Hawkes, A. D.; Jensen, D J.; MacKenzie, A. L; Beuzenberg, V.; Quilliam, M.A.; Olseng, C. D.; Samdal, I. A.; Aasen, J.; Selwood, . I.; Cooney, J. M.; Sandvik, M.; Miles, C. O, *Toxicon*, **2005**, 46(2), p.160.

5. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R.. *J. Chromatography A*, **2002**, *968*, p. 61.
6. Goto, H.; Igarashi, T.; Yamamoto, M.; Yasuda, M.; Sekiguchi, R.; Watai, M.; Tanno, K.; Yasumoto, T. *J. Chrom. A* **2001**, *907*, p. 181.

3.6 Analisi del dinoflagellato *Prorocentrum lima* mediante RPLC- MS

I dinoflagellati appartenenti ai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum* sono considerati i produttori di tossine polieteree ad azione diarroica-tumor promoter quali l'acido Okadaico (OA), la DTX 1 e di una serie di derivati¹. Tali derivati sono stati recentemente scoperti e denominati esteri diolici di OA, sulla scorta delle loro caratteristiche strutturali in quanto essi presentano un'esterificazione della funzione carbossilica dell'OA. E' nota anche l'esistenza di una serie di derivati di tipo 7-0-acilico non di origine planctonica, ma prodotti dal metabolismo dei mitilili, i quali dopo aver accumulato per filtrazione l'OA nel loro organo digestivo, promuovono la formazione di un legame di tipo acilico tra l'ossigeno in posizione 7 dell'OA e acidi carbossilici saturi o insaturi.



| | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|---------------------|----------------|------------------|----------------|
| Acido okadaico | OH | H | OH |
| OA metil ester | OH | OCH ₃ | OH |
| OA etil ester | OH | OEt | OH |
| a diol ester | OH | a | OH |
| b diol ester | OH | b | OH |
| c diol ester | OH | c | OH |
| d diol ester | OH | d | OH |
| OA D ₇ a | OH | e | OH |
| OA D ₇ b | OH | f | OH |
| OA D ₈ | OH | g | OH |
| OA D ₉ a | OH | h | OH |
| OA D ₉ b | OH | i | OH |

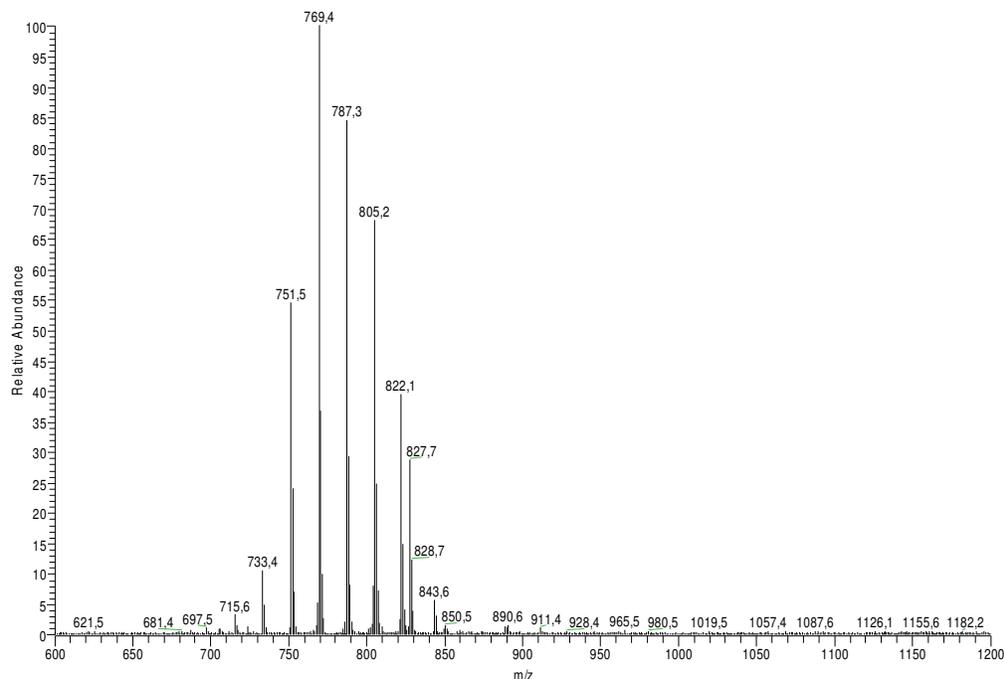
In considerazione del fatto che la maggior parte dei derivati su descritti, sono stati isolati e caratterizzati da colture cellulari degli organismi produttori,

un ceppo di *P. lima*, prelevato dal Mar Adriatico, è stato messo in coltura, e successivamente analizzato allo scopo di valutarne il profilo tossico.

3.6.1 Risultati

Le cellule di *Procentrum lima* sono state raccolte nel mar Adriatico nordoccidentale in un periodo di massima fioritura di tale specie, coincidente con un periodo in cui i controlli di routine hanno messo in luce che i mitili erano positivi al saggio di tossicità sul topo per le DSP tossine. Le cellule sono state poste in coltura, presso i laboratori dell'Università di Bologna; sono state poi centrifugate ed il pellet (215.340.000 cellule), congelato e liofilizzato, è stato inviato presso i nostri laboratori per l'analisi chimica mediante LC-MS. Il pellet è stato estratto per sonicazione con una miscela MeOH/H₂O 8:2 e successivamente ripartito, per 2 volte con *n*-esano. Un'aliquota dell'estratto idrometanolico è stata sottoposta ad indagine LC-MS per indagare sulla presenza di OA. A tal proposito, è stato necessario effettuare esperimenti preliminari in modalità FIA (*Flow Injection Analysis*) a ioni positivi su spettrometro di massa a trappola ionica impiegando uno standard di acido okadaico disponibile in commercio. Tutti i parametri della sorgente (capillary voltage, capillary temperature, gas flow, etc.) sono stati ottimizzati aggiungendo costantemente OA al flusso dell'HPLC attraverso la valvola rheodyne, in modo da ottenere una massima sensibilità di rivelazione di OA. Lo spettro di massa ottenuto, nelle condizioni di ionizzazione ottimizzate, mostrava non solo la presenza dello ione pseudo molecolare [M+H]⁺ a *m/z* 805, il suo addotto con l'ammonio [M+NH₄]⁺ a *m/z* 822 e il suo addotto con il sodio [M+Na]⁺ a *m/z*

827, ma anche la presenza di un caratteristico cluster di ioni derivanti da perdite di molecole di H₂O a partire dallo ione protonato [M+H]⁺.



Spettro FS MS a ioni positivi dell'OA standard

La separazione cromatografica è stata poi ottenuta su colonna a fase inversa Hypersil C8 BDS ed una fase mobile contenente ammonio formiato e acido formico, come suggerito da Quilliam *et al.* per le analisi delle tossine lipofile².

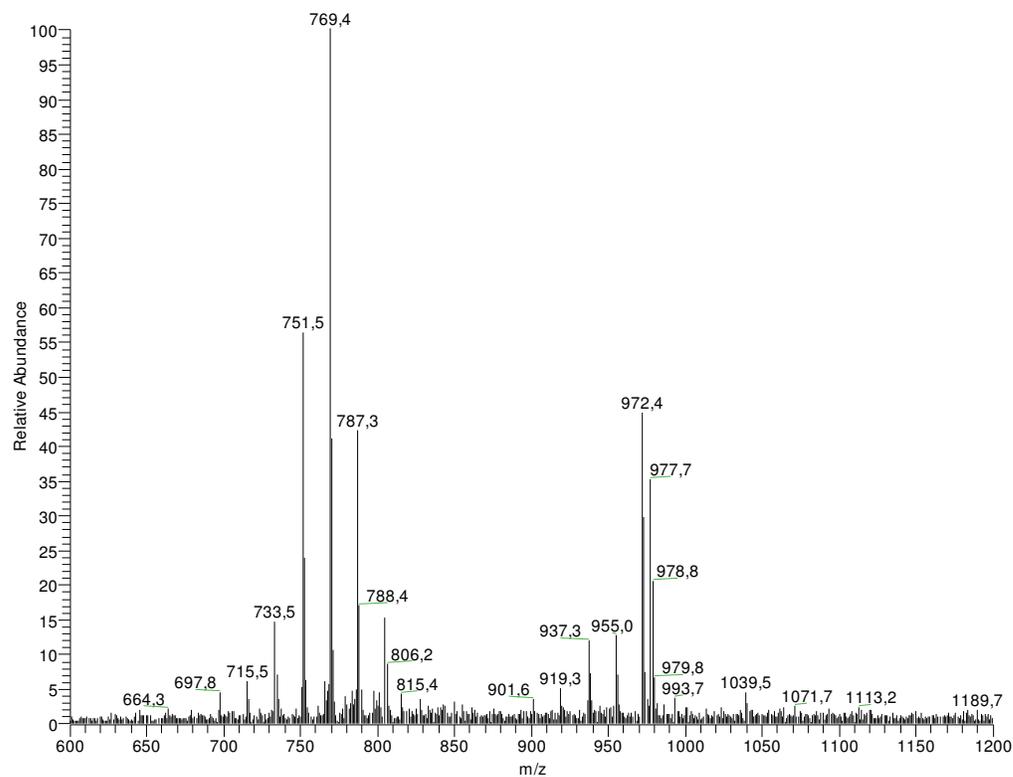
A questo punto siamo passati all'indagine dell'estratto di *P. lima*. Gli spettri *full scan* MS a ioni positivi dell'estratto grezzo, mostravano nell'XIC per lo ione a *m/z* 805, un picco cromatografico dominante che eluiva ad un tempo di ritenzione di 8.72 min con il corrispondente spettro di massa che mostrava oltre al picco pseudomolecolare [M+H]⁺ a *m/z* 805, ed ai suoi addotti con i cationi, la presenza del cluster di ioni che l'OA aveva mostrato in fase di ottimizzazione

dei parametri di sorgente. Tale picco poteva dunque essere assegnato all'acido okadaico, sulla base del confronto del tempo di ritenzione e del peso molecolare con quelli del campione di OA standard. Al fine di ottenere un dato quantitativo, l'estratto grezzo è stato analizzato in modalità SIM a ioni positivi monitorando lo ione m/z 805.2, con il suo addotto con l'ammonio $[M+NH_4]^+$ su spettrometro di massa a triplo quadrupolo, che paragonato ad un'analizzatore a trappola ionica, fornisce risultati quantitativi più affidabili. Per confronto con uno standard di OA iniettato nelle stesse condizioni sperimentali, è stato possibile constatare la presenza di $0.0145 \text{ pg cellula}^{-1}$ di OA nell'estratto grezzo.

Successivamente una porzione dell'estratto è stata sottoposta ad una reazione di idrolisi basica con NaOH 2.5 M ed analizzata nuovamente in LC-MS in modalità SIM a ioni positivi con lo scopo di misurare un potenziale incremento della concentrazione di OA nell'estratto dopo l'idrolisi indicativo della presenza di eventuali derivati esterei di OA. I risultati LC-MS registrati sull'estratto idrolizzato, confrontati con quelli ottenuti prima dell'idrolisi, hanno mostrato un aumento della quantità di acido okadaico nell'estratto del 70% in seguito alla reazione, che ha fatto sospettare la presenza di derivati dell'OA stesso. Ciò ci ha spinti ad una purificazione cromatografica dell'estratto grezzo, realizzata tramite colonna a fase diretta eluita con un gradiente di solventi da *n*-esano ad AcOEt fino a MeOH. Le frazioni ottenute sono state analizzate in modalità *full scan* MS a ioni positivi con analizzatore a trappola ionica, il quale rispetto ad un triplo quadrupolo fornisce elevata sensibilità, anche in modalità *full scan* MS, permettendo di individuare nuovi analoghi con pesi molecolari non noti. I parametri di ionizzazione e le condizioni cromatografiche utilizzate sono state quelle impiegate per la rivelazione dell'acido okadaico standard.

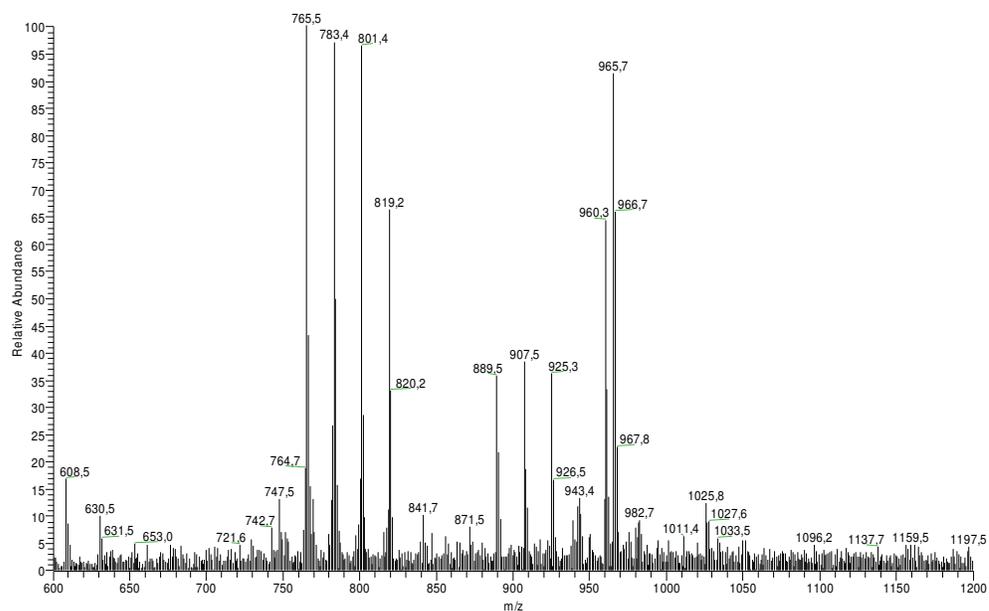
Dopo l'acquisizione, gli spettri *full scan* MS, registrati nel range di massa m/z 600-1200, sono stati elaborati generando dei XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) per ciascuno ione corrispondente all'OA o ad un suo derivato estereo al carbossile, riportato in letteratura (come indicato in tabella nella parte sperimentale).

In particolare, la frazione 7 mostrava la presenza del derivato OA D8 in forma pura ed in concentrazione tale da essere individuabile anche tramite esperimenti NMR monodimensionali quali ^1H e bidimensionali quali il COSY (*CORrelation SpettroscopY*, esperimento di correlazione omonucleare di *chemical shift* attraverso l'accoppiamento scalare *spin-spin*). La frazione 13 conteneva l'OA, nella frazione 5, invece si notava la presenza del derivato DTX1 e di OA etil estere, la frazione 10 presentava l'OA+C₂H₇O₅, mentre nella frazione 6 era evidente la presenza di una sostanza a m/z 955, che eluiva ad un tempo di ritenzione di 9.42 min, vicino agli altri derivati dell'OA, ma che non corrispondeva a nessuno dei derivati noti. Tuttavia tale sostanza era sospetta in quanto, lo spettro di massa corrispondente all'XIC per lo ione a m/z 955, accanto allo ione protonato $[\text{M}+\text{H}]^+ = 955$ e all'addotto con il sodio e quello con l'ammonio pari ad $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 977$ ed $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 972$, mostrava il caratteristico cluster di ioni tipico dell'acido okadaico che poteva derivare dallo ione pseudomolecolare, per eventuale perdita della catena laterale esterificante e successive perdite di molecole d'acqua.



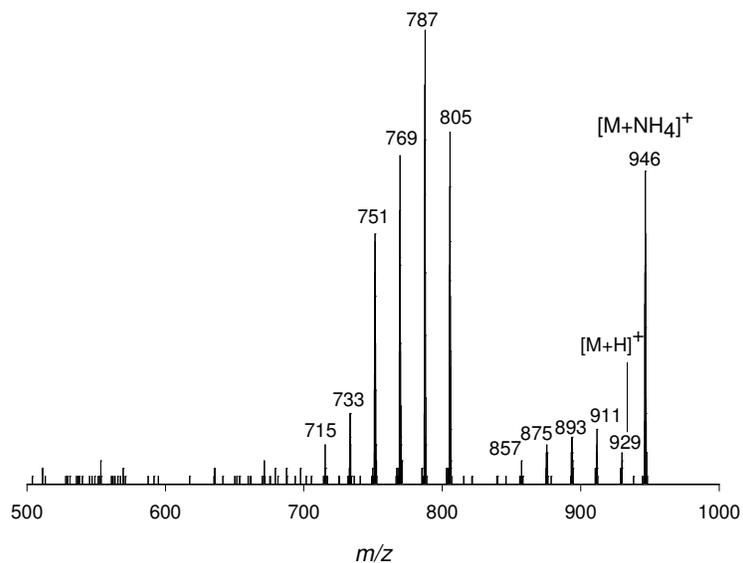
Spettro Full scan MS a ioni positivi della Fr 6, XIC dello ione a m/z 955

Un'ulteriore sostanza a m/z 943 che eluiva a tempo di ritenzione di 10.34 min presente nella frazione 6, risultava sospetta in quanto, lo spettro di massa corrispondente all'XIC per lo ione a m/z 943, oltre allo ione protonato $[M+H]^+ = 943$ ed agli addotti $[M+Na]^+ = 965$ ed $[M+NH_4]^+ = 960$, esibiva il caratteristico cluster ionico mostrato dalla DTX1 (che differisce dall'acido okadaico per un singolo metile), che poteva derivare dallo ione pseudomolecolare per eventuale perdita della catena laterale esterificante e successive perdite di molecole d'acqua.



Spettro Full scan MS a ioni positivi della Fr 6 XIC di m/z 943

Erano dunque necessari esperimenti di MS/MS per poter affermare con certezza che si trattava di due nuovi derivati esterei, uno dell'OA e l'altro della DTX1. A questo proposito, ci siamo avvalsi dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo, nella modalità di acquisizione *Precursor Ion Scan* (PIS). Per stabilire le condizioni di ionizzazione e frammentazione da impiegare abbiamo utilizzato il derivato noto OA D8, da noi isolato nella frazione 7, per mettere a punto esperimenti di MS/MS a ioni positivi sull'analizzatore quadrupolare. A questo scopo, lo ione addotto con l'ammonio $[M+NH_4]^+$ di OA D8 a m/z 946 è stato selezionato come ione precursore, in quanto risultava più intenso dello ione protonato. Lo ione è stato poi frammentato ottimizzando il valore dell'energia di collisione fino a quello più adatto (15 eV) a mantenere comunque la presenza dello ione padre m/z 946, e contemporaneamente incrementare la formazione degli ioni figli. E' stato così ottenuto lo spettro di MS/MS a ioni positivi dell'OAD8.



Spettro full scan MS/MS a ioni positivi dell'OA D8

Come si può notare dallo spettro MS/MS dell'OA D8, la frammentazione avviene per perdita di molecole neutre, infatti è evidente la presenza di due caratteristici cluster di ioni frammento i) ioni a m/z 911, 893, 875 e 857 dovuti a successive perdite di molecole d'acqua dallo ione pseudo-molecolare m/z 929; ii) ioni a m/z 805, 787, 769, 751, 733 e 715 dovuti alla perdita strutturale della catena laterale che esterificava la funzione carbossilica di OA e ad associate perdite d'acqua dallo ione pseudo-molecolare.

Successivamente, nelle condizioni di ionizzazione e frammentazione ottimizzate, sono stati eseguiti esperimenti PIS, tesi ad evidenziare la presenza di tutti i composti presenti nella frazione analizzata, il cui ione molecolare frammentava dando luogo ad un preciso ione frammento da noi selezionato ovvero lo ione m/z 805 in un caso e m/z 819 nell'altro. Lo spettro PIS relativo allo ione prodotto a m/z 805 corrispondente all'OA, mostrava la presenza di un

picco cromatografico che eluiva a tempo di ritenzione di 9.42 minuti che confermava l'esistenza di ioni precursori. Lo spettro di massa corrispondente a questo picco cromatografico rivelava, in veste di ioni precursori, gli ioni a m/z 955 $[M+H]^+$ ed il suo addotto con l'ammonio $[M+NH_4]^+$ a m/z 972, in perfetto accordo con i risultati ottenuti sullo spettrometro con analizzatore a trappola ionica in modalità *full scan* MS.

Lo spettro PIS relativo allo ione prodotto a m/z 819, corrispondente alla DTX1, mostrava la presenza di un picco cromatografico che eluiva a tempo di ritenzione di 10.33 minuti, che ancora una volta confermava l'esistenza di ioni precursori. Lo spettro di massa corrispondente a questo picco cromatografico rivelava, in veste di ioni precursori, gli ioni a m/z 943 $[M+H]^+$ ed il suo addotto con l'ammonio $[M+NH_4]^+$ a m/z 960, in perfetta coerenza con i risultati ottenuti sulla trappola ionica in modalità *full scan* MS.

E' stata dunque confermata, grazie all'elevata sensibilità delle sofisticate tecniche LC-MS impiegate, la presenza di un nuovo analogo di tipo estereo dell'OA, e di un nuovo analogo di tipo estereo della DTX1. Purtroppo la quantità di materiale a disposizione, era troppo bassa per effettuare una completa elucidazione strutturale delle nuove molecole. A tale scopo, sono dunque necessarie colture in grande scala del dinoflagellato *P. lima*, da cui purificare quantità di prodotti sufficiente per studi NMR.

3.6.2 Parte sperimentale

Generale. Le analisi di massa sono state eseguite su uno spettrometro con sorgente di ionizzazione Turbospray (TSI) a ioni positivi e negativi, e analizzatore a triplo quadrupolo API 2000 Applied Biosystem e uno spettrometro LCQ Classic ion trap con sorgente ionspray (ISI). Entrambi gli strumenti sono stati connessi ad un sistema HPLC HP modello 1100 (Agilent, USA).

Gli esperimenti LC-MS sono stati eseguiti su colonna Hypersil C8 BDS, 50 x 2.00mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a temperatura ambiente. L'eluente A è costituito da H₂O e B da una miscela al 95% CH₃CN/H₂O; entrambi gli eluenti contenevano un tampone 3.5 mM formiato d'ammonio, 50 mM acido formico. Un'eluizione a gradiente (dal 10% al 100% B in 10min, e poi il 100% B per 15 min.) è stata necessaria per l'analisi combinata dell'OA e dei suoi derivati. Sono state effettuate iniezioni di 5µl nella maggior parte dei casi. Il flusso è stato settato a 200 µl/min.

Gli spettri di massa *full scan* MS, eseguiti sullo spettrometro LCQ classic sono stati registrati nel range di massa *m/z* 600-1200, in modalità electrospray a ioni positivi. E' stata impiegata una capillary temperature di 170°C, un capillary voltage di 7 V, un tube lens offset di 55 V, uno spray voltage di 5 KV; e rispettivamente uno sheath gas flow e auxiliary gas flow di 80 e 20 (unità arbitrarie).

I cromatogrammi estratti (XIC) dell'OA e dei suoi derivati sono stati ottenuti selezionando gli ioni riportati nella tabella seguente:

| Tossina | [M+H] ⁺ | [M+NH ₄] ⁺ |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| OA | 805 | 822 |
| DTX1 | 819 | 836 |
| OA etil estere | 833 | 850 |
| OA metil estere | 819 | 836 |
| OA D8 | 929 | 946 |
| OA D7 a/b | 915 | 932 |
| OA D9 a/b | 943 | 960 |
| OA D8+C ₂ H ₄ | 957 | 974 |
| OA D8+C ₂ H ₇ O ₅ | 1091 | 1108 |
| OA+O | 945 | 962 |
| OA Estere diolico a/d | 945 | 962 |
| OA Estere diolico b | 943 | 960 |
| OA Estere diolico c | 941 | 958 |

Nel caso dello spettrometro di massa API 2000, l'acquisizione è stata condotta in modalità SIM monitorando lo ione [M+H]⁺ a m/z 805 e l'addotto [M+NH₄]⁺ a m/z 822 relativi all'acido okadaico. In questo esperimento la temperatura del turbogas (T) è stata settata a 0°C, l'ionspray voltage (IS) a 5500 V, il declustering potential (DP) a 60 V, il focusing potential (FP) a 382 V, e l'entrance potential (EP) a 5 V. Gli esperimenti *Precursor Ion Scan* (PIS) sono stati effettuati selezionando lo ione m/z 805 e m/z 819 rispettivamente per indagare la presenza di derivati esterei dell'OA e della DTX1 impiegando un'energia di collisione del 15 eV, un cell exit potential (CXP) di 20 V.

Campioni Lo standard di acido okadaico è stato fornito dalla Sigma Aldrich.

Estrazione. Le cellule di *Procentrum lima* sono state raccolte nel mar Adriatico nordoccidentale in un periodo di massima fioritura di tale specie, coincidente con un periodo in cui i controlli di routine hanno messo in luce che i mitili erano positivi al saggio di tossicità sul topo per le DSP tossine. Le cellule sono state poste in coltura, presso i laboratori dell'Università di Bologna; sono state poi centrifugate ed il pellet (215.340.000 di cellule), congelato e liofilizzato, è stato inviato presso i nostri laboratori per l'analisi chimica mediante LC-MS. Il pellet è stato estratto aggiungendo 80 ml di una miscela di MeOH/H₂O (8:2, v/v), mediante sonicazione con l'ausilio di un bagnetto di ghiaccio. La sospensione è stata centrifugata a 5000 rpm per 10 min ed il pellet cellulare è stato successivamente estratto con 80 ml di metanolo ripetendo la procedura su riportata alla fine aggiungendo 20 ml di H₂O in modo da portare il rapporto MeOH/ H₂O ad 8:2 v/v. I due filtrati sono stati riuniti, ottenendo un volume di 180 ml. L'estratto è stato successivamente sottoposto ad una ripartizione con *n*-esano (per 2 volte) ed un'aliquota pari ad 1 ml della fase idrometanolica, è stata analizzata direttamente all' LC-MS.

L'estratto restante (430 mg) è stato successivamente purificato su colonna a caduta libera, impaccata con gel di silice 60 (70-230 mesh) ed eluita usando un sistema a gradiente di solventi da *n*-esano a AcOEt fino a MeOH ottenendo 19 frazioni, ciascuna delle quali successivamente analizzata in *full scan* MS.

Reazione di idrolisi. 500 µl dell'estratto MeOH/H₂O (8:2, v/v) di *P. lima*, pari alla duecentesima parte dell'estratto totale, è stata sottoposta a reazione di idrolisi aggiungendo 0.125 ml di una soluzione di NaOH 2.5 M in MeOH al 90%. La reazione è lasciata, sotto agitazione magnetica, alla temperatura di 70°C, per la durata di 40 min. In seguito il pH della soluzione è

stato portato alla neutralità aggiungendo 0.125 ml di una soluzione di HCl 2.5 M. in MeOH al 90%. L'estratto idrolizzato è stato quindi analizzato all'LC-MS.

3.6.3 Riferimenti bibliografici

1. Marr, J. C.; Jackson, A. E.; McLachlan, J. L., *Journal of Applied Phycology*, **1992**, 4 (1), p.17.
2. Quilliam, M.A.; Hess, P.; Dell'Aversano, C. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Century*, Eds: W.J. deKoe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert and MMM. Sabino, **2001**, pp. 383.