

Egoitza Nagusia / Sede Central

Txatxarramendi Ugarteia z/g

E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Parque Tecnológico de Bizkaia

Astondo bidea - Edificio 609

E-48160 Derio - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Herrera Kaia - Portu aldea z/g

E-20110 Pasaia - Gipuzkoa (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

[www.azti.es](http://www.azti.es)

[info@azti.es](mailto:info@azti.es)



# SEGURFISH - Nuevas metodologías para garantizar la seguridad alimentaria de productos pesqueros

## Convenio AZTI/DAPA

### Informe Final 2013

para:

Eusko Jaurlaritza - Gobierno Vasco, Dpto. de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, Viceconsejería de Pesca e Industrias Alimentarias

Derio, 21 de Febrero de 2014

<b>Tipo documento</b>	Informe Final
<b>Título documento</b>	Informe Final 2013
<b>Fecha</b>	21/02/2014
<b>Proyecto</b>	SEGURFISH- Nuevas metodologías para garantizar la seguridad alimentaria de productos pesqueros
<b>Código</b>	IA13SEGFIS
<b>Cliente</b>	Eusko Jaurlaritza - Gobierno Vasco, Dpto. de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, Viceconsejería de Pesca e Industrias Alimentarias
<b>Equipo de proyecto</b>	Alejandro Barranco Sandra Rainieri

<b>Responsable proyecto</b>	Alejandro Barranco
-----------------------------	--------------------

---

<b>Revisado por</b>	Kepa Escuredo
<b>Fecha</b>	

---

<b>Aprobado por</b>	Kepa Escuredo
<b>Fecha</b>	

---

## ÍNDICE

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	4
2. METODOLOGÍA.....	5
3. PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS-BENEFICIOS GENERADOS .....	8
4. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA, DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN .....	13
5. CONCLUSIONES .....	14
6. BIBLIOGRAFÍA.....	15
AGRADECIMIENTOS.....	16

## 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Este informe recoge todas las actividades y resultados realizados dentro del proyecto IA13SEGFIS desde su inicio en enero 2013 hasta diciembre 2013 y que lleva por título: SEGURFISH: Nuevas metodologías para garantizar la seguridad alimentaria de productos pesqueros. Este proyecto, enmarcado dentro del convenio marco entre AZTI y el DAPA, ha ayudado a cofinanciar el proyecto del Plan Nacional ATP-ToxBio con el objetivo de avanzar en el desarrollo de nuevas metodologías para la evaluación de contaminantes presentes en alimentos.

El proyecto SEGURFISH pretende evaluar la aplicación de un nuevo enfoque para garantizar la seguridad alimentaria basado en la determinación de los efectos tóxicos que pudieran generar los productos pesqueros debido a la contaminación ambiental y a los procesos de producción. En contraposición a la metodología tradicional (de la detección de residuos de contaminantes se llega a la identificación y caracterización del riesgo) se pretende, mediante la detección de efectos tóxicos, llegar a la identificación del agente causante. Para ello, es necesario crear y seleccionar un grupo de biomarcadores adecuado haciendo necesario ampliar el estudio a un mayor número de compuestos tóxicos para poder cubrir el mayor espectro posible de residuos susceptibles de aparecer en productos pesqueros.

Los principales objetivos establecidos para el año 2013 han sido:

- Continuar con la caracterización de los efectos causados por los principales grupos de contaminantes (metales pesados, contaminantes orgánicos, pesticidas, nanopartículas y otros contaminantes emergentes) que se pueden encontrar en productos pesqueros.
- Crear y seleccionar un grupo de biomarcadores de los efectos encontrados.
- Optimizar un protocolo de preparación de la muestra compatible con el bioensayo en pez cebra.

## **2. METODOLOGÍA**

En el 2013 el trabajo se ha ampliado al estudio de más contaminantes cuyos residuos pueden aparecer en productos alimentarios: nanopartículas metálicas, una mezcla de metales pesados retardantes del fuego bromados considerados como contaminantes emergentes (Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano, Decabromodifenileter) y clorpirifos (CPE). A continuación se muestra la metodología seguida a lo largo del proyecto.

### **2.1. Vigilancia tecnológica**

Se ha llevado a cabo una búsqueda en las principales bases de datos nacionales e internacionales (ScienceDirect, Google Scholar, Web of Science) en las que se recogen los trabajos de la comunidad científica, Esta búsqueda ha estado centrada en aquellos resultados alineados con el objetivo del presente proyecto: otros estudios toxicogenómicos, bioensayos, efectos de diferentes grupos de contaminantes, metodologías para los estudios de biodisponibilidad....

Además, se han utilizado otros medios para obtener información como Internet, la inspección mensual de las revistas más importantes en el área de nuevos métodos analíticos y de toxicología y la legislación que concierne a los contaminantes bajo estudio en este proyecto.

### **2.2. Caracterización de los contaminantes**

Previamente a la evaluación de sus efectos tóxicos, se ha estudiado la estabilidad de las sustancias seleccionadas en el medio de exposición. Para ello, se ha optimizado la composición del medio así como diferentes parámetros que se pueden variar (adición de aditivos, presencia/ausencia de luz y tiempo de exposición) sin afectar o al menos mínimamente, el normal desarrollo de las larvas de pez cebra.

La concentración de los contaminantes ha sido monitorizada a lo largo de la duración de los experimentos. En el caso del CPE y los otros compuestos orgánicos

(Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano, Decabromodifenileter), los análisis se llevaron a cabo por cromatografía líquida acoplada a un detector ultravioleta-visible y a un espectrómetro de masas (LC-MS). Asimismo, se puso a punto un método para identificar y cuantificar la presencia de metabolitos. En el caso de las nanopartículas, los análisis se llevaron a cabo por espectroscopía de absorción atómica y se ha optimizado una metodología para su medida con un electrodo de ión selectivo (ISE). Los metales pesados también se cuantificaron por absorción atómica.

### **2.3. Obtención de extractos-Biodisponibilidad**

Para estudiar la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en los alimentos terminado de optimizar una metodología de digestión *in vitro*, adaptación del modelo de Hur et al., 2009. Durante el 2013 se ha estudiado el efecto sobre el CPE que tiene el proceso completo de digestión. Los extractos obtenidos fueron analizados por LC-MS.

### **2.4. Evaluación de la toxicidad**

Una vez caracterizados los contaminantes que se están estudiando en este proyecto se ha evaluado su toxicidad en medio acuoso en larvas de pez cebra. Las condiciones y los tiempos de exposición utilizados se definieron en base a las características de los mismos contaminantes. La exposición se ha realizado utilizando lotes de 25 larvas de 3 y 4 días de edad que se han puesto en placas Petri de 6 cm de diámetro y se han incubado a 27°C durante 24 horas en el caso del CPE y 48 h en el caso de las NPs y los metales. Todas las exposiciones se han realizado por triplicado siguiendo el mismo protocolo establecido el año pasado.

Así, los compuestos orgánicos han sido solubilizados en medio de crecimiento para larvas (embryo water) utilizando co-solventes mientras que las NPs y los metales se han solubilizado directamente en embryo water. En el caso de los metales fue necesario ajustar el pH de la disolución final para que fuera compatible con el crecimiento de las larvas.

Tras la exposición se ha determinado el porcentaje de muerte acumulada de las larvas. Las larvas vivas se han congelado y se han utilizado para extraer RNA total

mediante Trizol. Sucesivamente se ha testado la expresión diferencial de diferentes genes biomarcadores de toxicidad. En el caso del CPE se han testado: AHRR2, CYP1A1, GSTp1, HSP70 y p53. Mientras que en el caso de las NPs nanoplata se han validado algunos genes obtenidos de un estudio trascriptómico mediante microarray. La validación de los genes detectados por microarray se ha llevado a cabo mediante qRT-PCR.

Además, para la nanoplata y también para la exposición a CPE se ha detectado el nivel de muerte celular por tinción con naranja de acridina y siguiente observación a la lupa fluorescente

### 3. PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS-BENEFICIOS GENERADOS

#### 3.1. Vigilancia tecnológica

A lo largo del 2013 se ha continuado con la tarea de revisión de las novedades sobre el análisis dirigido por efectos tanto en muestras medioambientales como alimentarias.

Dentro de la evaluación de los efectos de la nAg un aspecto importante es la determinación de la cantidad de plata iónica en equilibrio con la nanopartícula y cómo va cambiando durante la exposición. Con este fin se han buscado metodologías que permita su determinación de una manera relativamente sencilla. Se encontró que los electrodos de ión selectivo pueden ser una alternativa sencilla y económica para la detección de iones plata en presencia de nanopartículas.

En relación con las nanopartículas metálicas se ha llevado a cabo una vigilancia más exhaustiva sobre sus efectos tóxicos, presencia en alimentos y métodos para su determinación. Los resultados de esta vigilancia tecnológica se han recogido en un artículo enviado a la revista *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* y titulado: *"The safety assessment of engineered metallic nanoparticles in foodstuff"*.

Asimismo, se ha continuado con la búsqueda de biomarcadores de la toxicidad de diferentes contaminantes químicos ambientales: algunos metales y compuestos orgánicos como los BFRs (brominated flame retardants) y PFC (perfluorinated compounds).

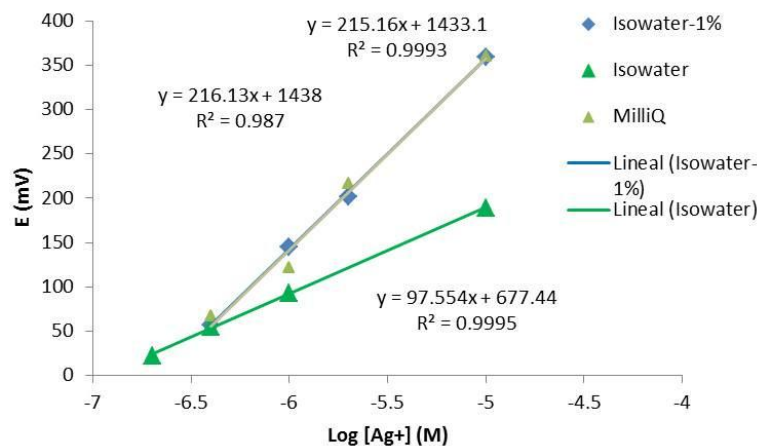
#### 3.2. Caracterización de los contaminantes

En esta tarea se ha optimizado una metodología para medir los iones plata en presencia de nAg. Con este fin se ha empleado un electrodo de ión selectivo a plata.

Uno de los parámetros críticos de esta técnica es la fuerza iónica del medio que se está midiendo. La sensibilidad y respuesta del electrodo es radicalmente distinta en agua MilliQ y en isowater. Por ello, es necesario realizar el calibrado en el mismo



medio en el que luego se van a medir las muestras. En la Figura 1 se muestran los calibrados realizados en tres condiciones diferentes.



**Figura 1.** Calibrados obtenidos con agua MilliQ, isowater al 1% y 100% de isowater.

Se observa una gran diferencia en la pendiente de los calibrados: en los medios con una fuerza iónica baja (hasta 1% de isowater) la pendiente es mucho más grande que en 100 % de isowater, pero en este último caso se mejora la sensibilidad pudiendo medir concentraciones más pequeñas.

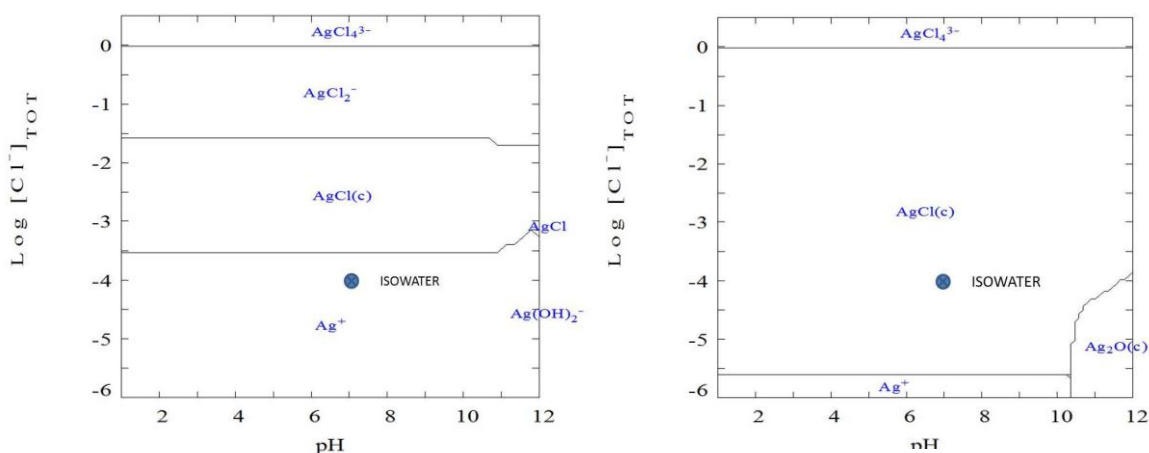
Una vez establecidos los calibrados se midió la cantidad de iones plata en los medios de exposición que contenían nanoplata a diferentes niveles de concentración. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos

**Tabla 1.** Porcentaje de iones plata medido en los diferentes medios preparados

Conc. nAg (ppm)	Isowater	MilliQ water
1	2.32	6.11
2.5	2.56	4.39
5	1.66	3.87
10	1.85	3.21

Según disminuye la concentración de nAg el porcentaje de iones aumenta y la cantidad de iones es más grande (casi tres veces) cuando la nanoplata está disuelta en agua MilliQ que en isowater. Este hecho puede ser explicado por la presencia de cloruros en isowater, ya que este anión forma complejos fácilmente con los iones plata haciendo que haya menos concentración libre en el medio. Se ha realizado un estudio teórico para confirmar este hecho, teniendo en cuenta los valores de las

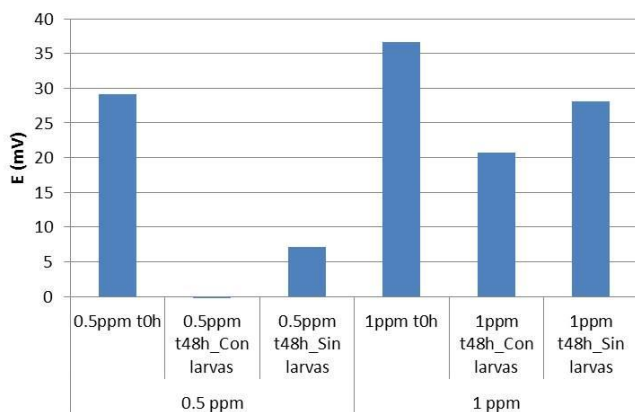
constantes de equilibrio de todos los complejos formados. De esta manera se obtiene una distribución de especies como se la que se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Diagramas de predominancia de especies de plata en Isowater

En función de la cantidad de Ag presente puede predominar la plata en forma iónica o el precipitado de AgCl. Esto no ocurre en el caso del agua MilliQ en el que la única especie que existe es la plata iónica.

La cantidad de iones también ha sido monitorizada a lo largo del tiempo de duración de la exposición a las larvas de pez cebra (ver Figura 3).



**Figura 3.** Señal medida al inicio y al final de la exposición a nAg (0.5 y 1 ppm)

Los resultados han mostrado un descenso en la cantidad de iones plata tanto en los experimentos con larvas como en los controles (sin larvas) siendo esta disminución mayor en el primero de los casos, pero siempre por debajo del 50%.

Por último, dentro de esta tarea de caracterización, también se ha estudiado la solubilidad de otros contaminantes emergentes como son los BFRs procediendo en

primer lugar a su caracterización. Se han seleccionado 3 sustancias a estudiar: tetrabromobisphenol-A (TBBP-A), hexabromociclododecano (HBCD) y decabromodifenil eter (DBDPE). Se ha observado una baja solubilidad en agua de casi todos ellos, sobre todo del (DBDPE). A excepción del TBBP-A (solubilidad alrededor de 1 ppm), en el resto de los casos será necesario añadir un co-solvente al medio de exposición para asegurar su solubilidad y estabilidad a lo largo de todo el experimento de exposición. Actualmente se están estudiando diferentes agentes solubilizantes, entre ellos los mismos que en el caso del CPE.

### 3.3. Obtención de extractos

En esta fase del proyecto se ha continuado con la optimización de las condiciones para la digestión *in vitro* y como contaminante modelo se está empleando el CPE. En el año 2012 se observó que la incubación con la saliva artificial afectaba muy poco a la cantidad de CPE que permanecía soluble. Una vez puesto a punto las composiciones de los jugos gástricos y biliares así como las condiciones de la incubación, se ha procedido a completar el estudio de la digestión. Los resultados han mostrado que al final del proceso no se alcanza el 40% de la cantidad inicialmente añadida. Esto indica que el CPE es metabolizado en gran medida por las enzimas presentes en el tracto digestivo. Actualmente se están analizando estas muestras por HPLC-MS con el fin de poder identificar los metabolitos resultantes de su degradación.

### 3.4. Evaluación de la toxicidad

#### 3.4.1. Mezcla de metales

Para evaluar de forma realista la toxicidad de los elementos químicos se decidió estudiar una mezcla de diferentes metales a diferentes concentraciones. Para ello se diseñó un experimento en el cual larvas de 3 días se expusieron a las mezclas de metales indicadas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Concentraciones (expresadas en ppb) de las mezclas de metales testados en larvas de pez cebra

	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4
Me-Hg	5	25	50	100
Cd	1	10	25	50
As	5	50	100	500
Ag	0.01	0.1	0.5	1

Tras 24h de exposición no se detectó mortalidad en las larvas expuestas. Sin embargo tras 48h de exposición, se detectó un 100% de mortalidad en las larvas expuestas al mix más concentrado (Mix 4).

Hasta la fecha se ha analizado la expresión génica de las larvas expuestas al Mix 1 y al Mix 2. Los resultados obtenidos indican que tanto el Mix 1 como el Mix 2 causan la inducción de gen *Mt*. El estudio de expresión génica será completado en breve y nos indicará si la mezcla de metales es más tóxica con respecto a los metales considerados individualmente.

### 3.4.2. Nanopartículas de titanio

Finalmente se han realizado estudios de toxicidad sobre el nanotitanio. En este caso se han testado las siguientes concentraciones: 2; 10; 50; 100ppm. En este rango de concentraciones no se ha detectado mortalidad por parte de las larvas expuestas. Para verificar si este compuesto produce efectos tóxicos sub-letales también se ha analizado la expresión diferencial de los siguientes genes *mt*, *hsp70*, *gstp1* y *cyp1a1*. En las condiciones testadas, el nanotitanio no ha producido algún efecto sobre los genes testados. En el futuro, se realizaran pruebas de apoptosis y muerte celular mediante la técnica TUNEL.

## 4. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA, DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN

Durante al año 2013 las actividades de difusión han sido las siguientes:

- Los resultados obtenidos a lo largo del año 2012 sobre la toxicidad y la evaluación del riesgo para la salud de los consumidores de la presencia de residuos de contaminantes en alimentos, han sido presentados en el congreso Eurofoodchem XVII celebrado en Estambul (Turquía) los días 7-10 de Mayo. Se ha realizado una presentación oral que llevaba por título: “*Tools for the toxic assessment of environmental contaminants in fish*”.
- Los resultados relativos a la nanoplasta, en conjunto con resultados obtenidos en otros proyectos, se han enviado a la revista Journal of Applied Toxicology en un artículo titulado *Toxic effects of colloidal nanosilver in zebrafish embryos and larvae*. (DOI 10.1002/jat.2975)
- Los resultados de la vigilancia tecnológica sobre nanopartículas metálicas se han recogido en un artículo enviado a la revista Quality Assurance and Safety of Crops & Foods y titulado: “*The safety assessment of engineered metallic nanoparticles in foodstuff*”.

## 5. CONCLUSIONES

- Se ha ampliado el estudio a más contaminantes cuyos residuos pueden aparecer en productos alimentarios. Nuevos contaminantes estudiados: nanopartículas metálicas, arsénico inorgánico, retardantes del fuego bromados considerados como contaminantes emergentes (Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano, Decabromodifenileter).
- Se ha puesto a punto una metodología para medir iones plata en los medios de exposición con nAg.
- Se han optimizado las condiciones experimentales para la evaluación de los efectos de los contaminantes seleccionados mediante el modelo animal pez cebra.
- Se ha optimizado el protocolo completo de digestión *in vitro* para la determinación de la bioaccesibilidad de los contaminantes en productos pesqueros comercializados en la CAPV. Se ha visto que en el caso del CPE, la bioaccesibilidad no supera el 40%.

Asimismo, se han analizado mezclas de metales cuyos resultados necesitan ser investigados en mayor profundidad. Con la finalidad de poder establecer un batería de genes biomarcadores para detectar la presencia de contaminantes en productos pesqueros y alcanzar el objetivo final del proyecto Segurfish se plantean los siguientes trabajos futuros:

- Completar el estudio de los efectos de los distintos contaminantes.
- Determinar la bioaccesibilidad de todos los contaminantes bajo estudio en muestras reales de productos pesqueros.
- Determinar los efectos en el modelo animal pez cebra de los extractos obtenidos después del proceso de digestión *in vitro*.
- Elaborar un listado de biomarcadores de los efectos encontrados para el futuro desarrollo de un biosensor de toxicidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Hur, S.J., Decker, E.A., McClements, D.J., 2009. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. *Food Chem.*, 114(1): 253-262.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido posible gracias a la ayuda de Miguel Ángel Pardo, Mónica Martínez, Mari Jose Sierra y Nagore Egurrola que han colaborado en el mantenimiento de los acuarios y en la realización de algunos ensayos. Asimismo queremos agradecer a Maider Olasagasti por su trabajo en los experimentos con nanopartículas.