

Egoitza Nagusia / Sede Central

Txatxarramendi Ugartea 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 2014

para:

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

Derio, 28 de Noviembre de 2014

<b>Tipo documento</b>	Informe Final
<b>Título documento</b>	Informe Final 2014
<b>Fecha</b>	28/11/2014
<b>Proyecto</b>	SEGURFISH- Nuevas metodologías para garantizar la seguridad alimentaria de productos pesqueros
<b>Código</b>	IA14SEGFIS
<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 Nadia Conlledo

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

---

<b>Revisado por</b>	Félix Amarita
<b>Fecha</b>	

---

<b>Aprobado por</b>	Félix Amarita
<b>Fecha</b>	

---

## ÍNDICE

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	4
2. METODOLOGÍA.....	6
3. PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS-BENEFICIOS GENERADOS .....	8
4. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA, DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN .....	13
5. CONCLUSIONES .....	15
6. BIBLIOGRAFÍA.....	17
AGRADECIMIENTOS.....	18

## 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Este informe recoge todas las actividades y resultados realizados dentro del proyecto IA14SEGFIS desde su inicio en enero 2014 hasta diciembre 2014 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 y el proyecto europeo ECsafeSEAFOOD 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.

El trabajo realizado durante el 2014 amplía el abanico de contaminantes estudiados con el fin de crear y seleccionar un grupo de biomarcadores adecuados que permitan la determinación de la presencia de residuos de estos compuestos en alimentos. En este sentido se han incluido compuestos retardantes de la llama (decabromodifenil éter-DBDPE, tetrabromobisfenol A-TBBPA y hexabromo ciclododecano-HBCD) y perfluorados (perfluorooctano sulfonato-PFOS y ácido perfluorooctanoico-PFOA). Asimismo también se han estudiado mezclas de elementos tóxicos (As, Ag, MeHg y Cd).

Los principales objetivos establecidos para el año 2014 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.
- Elaborar un listado de biomarcadores de los efectos encontrados.
- Determinar la bioaccesibilidad de todos los contaminantes bajo estudio en muestras reales de productos pesqueros.
- Diseñar un biosensor para la determinación de los biomarcadores seleccionados.

## **2. METODOLOGÍA**

En el 2014 el trabajo se ha ampliado al estudio de más contaminantes cuyos residuos pueden aparecer en productos alimentarios: mezclas de metales, retardantes del fuego bromados y compuestos perfluorados considerados como contaminantes emergentes. 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 de los compuestos orgánicos, los análisis se llevaron a cabo por cromatografía líquida acoplada a un detector ultravioleta-visible y a un

espectrómetro de masas (LC-MS). En el caso de los metales, los análisis se llevaron a cabo por espectroscopía de absorción atómica y LC/ICP-MS.

### **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 2014 se ha comenzado con la aplicación de esta metodología a los compuestos perfluorados. 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. Todas las exposiciones se han realizado por triplicado siguiendo el mismo protocolo establecido el año pasado.

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 mediante qRT-PCR.

### 3. PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS-BENEFICIOS GENERADOS

#### 3.1. Vigilancia tecnológica

A lo largo del 2014 se ha continuado con la tarea de revisión de las novedades sobre el análisis dirigido por efectos tanto en muestras medioambientales como alimentarias. En concreto el trabajo se ha centrado en los compuestos retardantes de la llama y perfluorados así como en las metodologías empleadas para la evaluación de sus potenciales tóxicos. Los resultados de esta vigilancia tecnológica se están analizando y serán empleados para la realización de un artículo de revisión que será enviado a la revista Environmental Research y titulado: “*Evaluation of the toxicity of emerging chemical contaminants in the marine environment*”.

#### 3.2. Caracterización de los contaminantes

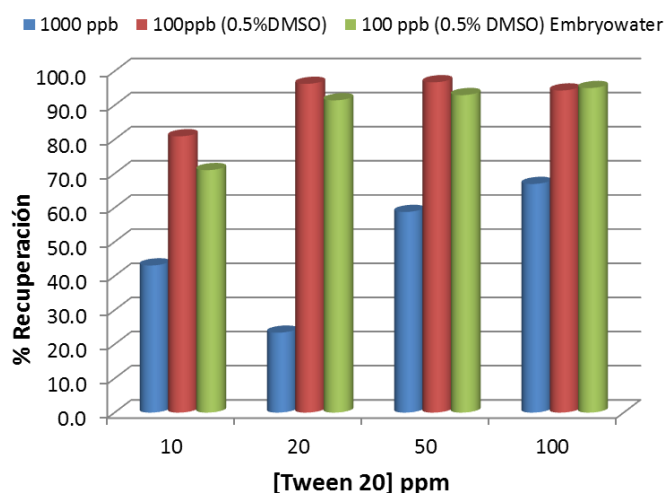
En primer lugar, se ha procedido a estudiar el modo de mantener en disolución y de una manera estable todos los compuestos orgánicos bajo estudio. Muchas de estas sustancias son solubles en agua a los niveles de concentración de interés (por ejemplo los compuestos perfluorados). Sin embargo, en algunos casos es necesario añadir co-solvente compatible con los test de toxicidad con larvas de pez cebra. Con este fin se ha escogido el DMSO debido a que es uno de los más utilizados por su baja toxicidad (hasta un 1%) y su alta capacidad de solubilizar sustancias muy apolares. Para comprobar este hecho, se han realizado una serie de experimentos preliminares con DBDPE, HBCD y TBBPA.

En el caso del TBBPA se ha observado que con 0.5% DMSO se consigue una solubilización de casi el 90% de 1 ppm de esta sustancia, mientras que para el caso del HBCD y el DBDPE la solubilidad era mucho menor no superando los 10 ppb. Con el fin de mejorar la solubilidad se ha probado la adición de diferentes co-solventes que han permitido conseguir una buena solubilidad de todas las sustancias testadas. Estos co-solventes en las condiciones experimentales utilizadas no causaron efectos negativos observables en el desarrollo de las larvas, al menos en los parámetros



medidos (básicamente toxicidad aguda y efectos subletales determinados por expresión diferencial de genes).

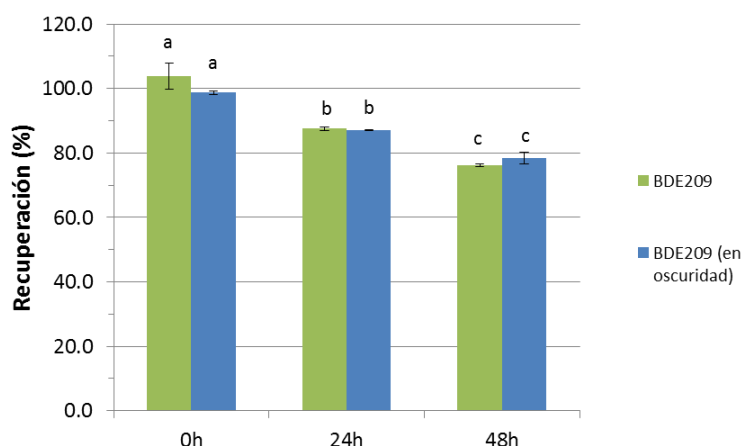
Otro factor importante que ha sido evaluado es la fuerza iónica del medio de exposición. Los experimentos realizados con el agua utilizada para el crecimiento de los embriones (con un importante contenido en sales) no han tenido ningún efecto sobre la solubilidad. En la Figura 1 se muestran los resultados para el caso del DBDPE.



**Figura 1.** Recuperación de DBDPE en diferentes medios en función de la concentración de Tween 20.

Esta metodología se ha aplicado también a compuestos perfluorados (perfluorooctano sulfonato-PFOS y ácido perfluorooctanoico-PFOA). Debido a que estas sustancias son solubles en agua no ha sido necesario añadir ningún aditivo.

Una vez estudiada la solubilidad se ha comprobado la estabilidad de los compuestos bajo estudio en el medio de exposición a lo largo del tiempo. Para ello, se ha utilizado la sustancia menos soluble que es el decabromodifenil eter (DBDPE) (solubilidad en agua:  $>0.1\mu\text{g/L}$ ). En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 2.** Estabilidad de una disolución de 100 ppb de DBDPE en el medio de exposición a lo largo del tiempo.

Se ha observado que la concentración va disminuyendo alcanzando el 80% del valor inicial a las 48h. Por ello, se ha establecido 24h como la duración adecuada de la exposición.

En el caso del PFOS y PFOA no se ha observado ninguna disminución de la concentración a lo largo del tiempo, siendo la recuperación de casi un 100%. Esto significa que no ocurre ningún fenómeno de metabolización o acumulación con el modelo de pez cebra.

### 3.3. Obtención de extractos

Durante este año se ha comenzado con el estudio de la digestión *in vitro* de las sustancias bajo estudio. Actualmente se está evaluando la bioaccesibilidad con disoluciones estándar de PFOS y PFOA.

### 3.4. Evaluación de la toxicidad

#### 3.4.1. Mezcla de metales

Se ha completado el estudio de los efectos tóxicos en larvas de una mezcla de varios metales (As, Ag, MeHg y Cd) a diferentes concentraciones (baja, media, alta y muy alta).

**Tabla 1.** 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
Se	3	15	35	70

Para profundizar en el estudio se testaron también algunos de los genes específicamente inducidos por exposición al metil mercurio que fueron inducidos en todos los casos testados.

### 3.4.3. Compuestos orgánicos

Se ha evaluado la toxicidad aguda de los siguientes compuestos: DBDPE, PFOS y PFOA. En el caso del DBDPE la siguientes concentraciones han sido estudiadas: 0.1; 1; 10; 25; 50; 75 y 100 ppb. No se observó mortalidad en ninguno de los experimentos y no se pudo aumentar la concentración debido a la baja solubilidad del DBDPE en las condiciones experimentales. Por lo tanto se concluye que el  $LC_{50}$  del DBDPE está por encima de 100 ppb.

En el caso del PFOS y PFOA no ha sido necesario añadir ningún aditivo al medio de exposición ya que son estables y bastante solubles en agua. Por ello se ha podido aumentar la concentración hasta 500 ppm. Las exposiciones a PFOA han proporcionado resultados con gran variabilidad (a 200 ppm se ha observado una menor mortalidad que a 150 ppm) que han impedido calcular un  $LC_{50}$ . Este hecho puede ser debido a determinados fenómenos físicos como agregación de partículas, pero requiere un estudio con mayor profundidad.

En al caso del PFOS a 100 ppm se observó un 36% de mortalidad estimándose un  $LC_{50}$  de 108.66 ppm. Actualmente se están evaluando los efectos sub-letales mediante la medida de la expresión diferencial de determinados genes.

### 3.4.4. Desarrollo de un biosensor

En base a los resultados obtenidos con otras sustancias así como de la información recogida del análisis de la bibliografía se ha visto que las enzimas del grupo del citocromo P450 (CYP) juegan un papel muy importante en el metabolismo de muchos contaminantes. Así, actualmente se han comenzado a llevar a cabo estudios de inhibición de algunas de estas enzimas con los compuestos bajo estudio: retardantes de la llama bromados y perfluorados.

## 4. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA, DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN

Durante al año 2014 las actividades de difusión han sido las siguientes:

- El artículo titulado Toxic effects of colloidal nanosilver in zebrafish embryos ha sido publicado en la revista Journal of Applied Toxicology: Vol 34(5), 562-575, Mayo 2014.
- Presentación oral en congreso internacional: M. Olasagasti, A. Barranco, M.A. Pardo, M. Martinez, S. Rainieri. Toxic effect of different commercial products containing Ag NPs on zebrafish embryos. 5<sup>th</sup> International IUPAC Symposium for Trace Elements in Food (TEF-5), 6-9 Mayo 2014, Copenhagen, Dinamarca.
- Poster en congreso internacional: A. Barranco, J. Sanz-Landaluze, R. Muñoz-Olivas, N. Conlledo, M. Martinez-Santos, S. Rainieri. Evaluation of the adverse effects of mixtures of trace metals in zebrafish embryos. 5<sup>th</sup> International IUPAC Symposium for Trace Elements in Food (TEF-5), 6-9 Mayo 2014, Copenhagen, Dinamarca.
- Ponencia en el Master de Nutrición y Salud de la UPV titulada “Ensayos de toxicidad con el modelo animal pez cebra” S. Rainieri. Noviembre 2014.
- Poster en congreso internacional: S. Rainieri, A. Barranco. Metallic nanoparticles: toxicity and safety issues. VII Jornadas Hispano- Francesas (IBERNAM-CMC2), 20-21 Noviembre 2014, Bilbao, España.
- Presentación en la II JORNADA TRANSFERENCIA RESULTADOS PLAN INVESTIGACIÓN SEGURIDAD ALIMENTARIA EUSKADI del trabajo Evaluación de los efectos tóxicos de residuos de cadmio, mercurio y arsénico en pescado y marisco. S. Rainieri. Bilbao, 21 Noviembre 2014.
- Poster en congreso internacional: S. Rainieri, M. Olasagasti, J. Sanz Landaluze, A.M. Coto, A. Barranco. Uptake and transcriptomic analysis of zebrafish embryos exposed to Methylmercury, Cadmium and to their

mixture. Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology, 1-2 Diciembre 2014, Paris, Francia.

## 5. CONCLUSIONES

- Se ha ampliado el estudio a más contaminantes cuyos residuos pueden aparecer en productos alimentarios. Nuevos contaminantes estudiados: retardantes del fuego bromados y compuestos perfluorados considerados como contaminantes emergentes (TBBPA, HBCD, DBDPE, PFOS y PFOA).
- Se han optimizado las condiciones experimentales para la evaluación de los efectos de los contaminantes seleccionados mediante el modelo animal pez cebra.
- Se ha completado el análisis de mezclas de metales. Se ha establecido la toxicidad aguda de los compuestos orgánicos estudiados obteniéndose valores de LC<sub>50</sub> altos (>100ppb).

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:

- Evaluar la toxicidad sub-aguda de los elementos retardantes del fuego bromados (Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano, Decabromodifenileter) y de PFOS y PFOA, todos considerados como contaminantes emergentes.
- Evaluar los efectos adversos de los metabolitos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- Completar un listado de biomarcadores de los efectos generados por todos los compuestos evaluados.
- Determinar la bioaccesibilidad de todos los contaminantes bajo estudio en muestras reales de productos pesqueros.
- Optimizar de un protocolo de preparación de la muestra compatible con el bioensayo en pez cebra.
- Desarrollar un biosensor para la determinación de los compuestos bajo estudio.

- Optimizar de la metodología de análisis dirigida por efectos (Effect Directed Analysis-EDA) y su aplicación a la evaluación de los potenciales efectos adversos generados por productos pesqueros contaminados.



## 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.