


Alternativas tecnológicas para la detoxificación de productos de mar



Dr Ana G Cabado
Food Safety Division
ANFACO-CECOPECA

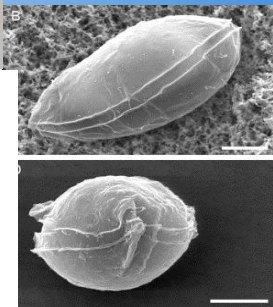
- 
1. HABs: toxinas legisladas en la UE y emergentes
 2. Impacto socio-económico de las HABs. Situación en Galicia.
 3. Estrategias para disminuir toxinas: alternativas legisladas
 4. Depuración *in vivo* de moluscos
 5. Protocolos de laboratorio
 6. Procedimientos industriales para disminuir toxinas

Harmful algal blooms (HABs)

Representan un fenómeno natural

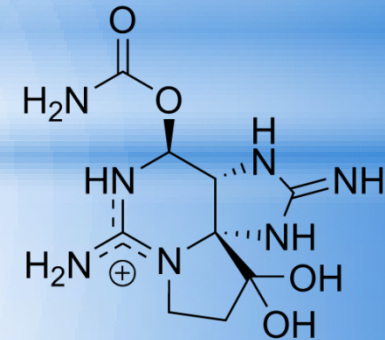
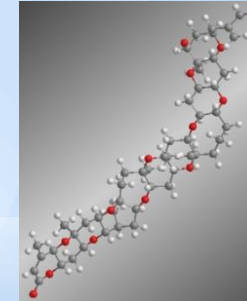
Proliferación de fitoplancton (cianobacterias, diatomeas, dinoflagelados) en ecosistemas acuáticos

Hay 90 microalgas marinas plantónicas capaces de producir toxinas, la mayoría son dinoflagelados.

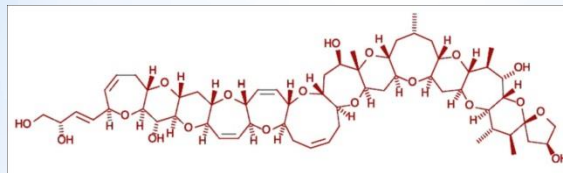


Toxinas en Europa: legisladas y emergentes

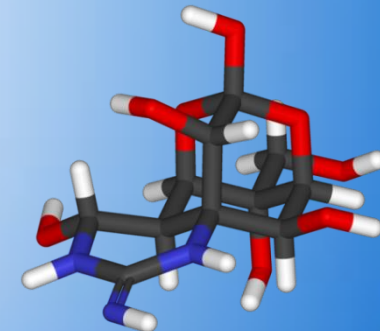
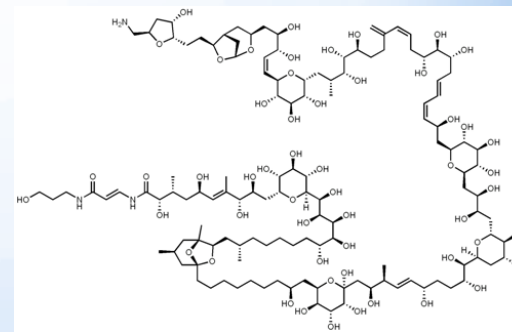
- Toxinas paralizantes (PSP): Saxitoxina y análogos
- Toxinas lipofílicas (antiguas diarreicas o DSP):
 - Acido okadaico (OA) y análogos
 - Grupo de los Azaspirácidos (AZAs)
 - Grupo de las Yesotoxinas (YTXs)
 - Grupo de las Pectenotoxinas (PTXs)
- Toxinas Amnésicas: Acido Domoico (DA) y análogos



Iminas Cíclicas



- Toxinas emergentes: Palitoxina
Tetrodotoxina
Ciguatoxina



Métodos de detección de toxinas

Toxinas lipofílicas: en molusco

LC-MS/MS

PP2A inhibition

11.1.2011

EN

Official Journal of the European Union

L 6/3

COMMISSION REGULATION (EU) No 15/2011

of 10 January 2011

amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs

(Text with EEA relevance)

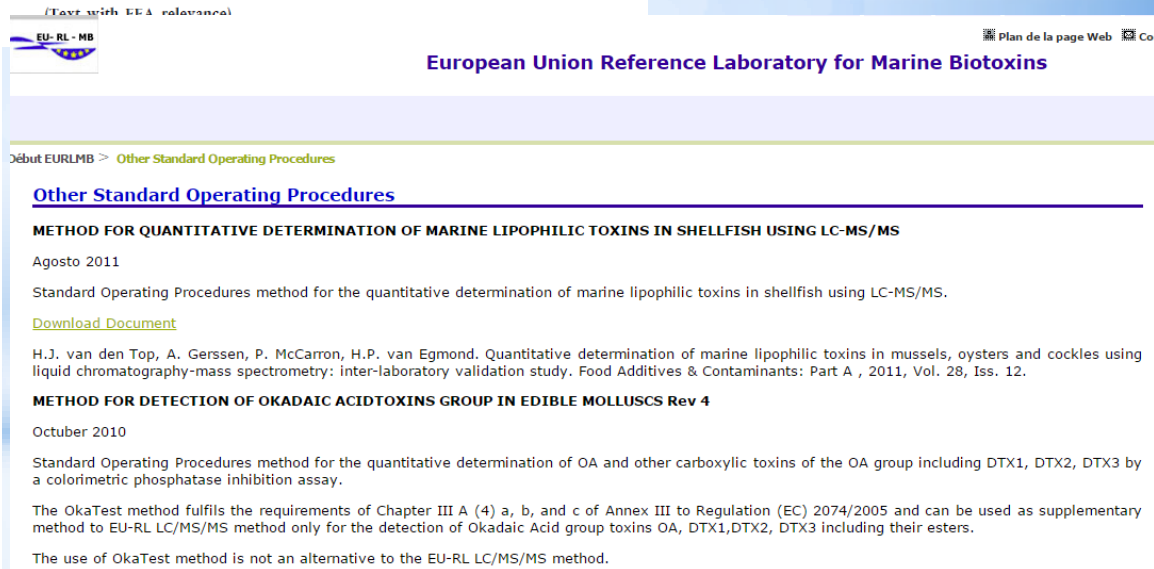


EU-RL-MB
EUROPEAN UNION REFERENCE
LABORATORY FOR MARINE
BIOTOXINS

**EU-Harmonised Standard Operating
Procedure for determination of
Lipophilic marine biotoxins in molluscs
by LC-MS/MS**

Version 5, January
2015

Coordination:
European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB)
Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN)
CITEXVI (Ciudad Tecnológica de Vigo)
Fonte das Abelieiras, s/n, Campus Universitario de Vigo, As Lagoas-Marcoense
36310 Vigo, Spain
e-mail: eurimb@csssi.es
<http://aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/home.shtml>



Plan de la page Web

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins

Début EURLMB > Other Standard Operating Procedures

Other Standard Operating Procedures

METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF MARINE LIPOPHILIC TOXINS IN SHELLFISH USING LC-MS/MS

Agosto 2011

Standard Operating Procedures method for the quantitative determination of marine lipophilic toxins in shellfish using LC-MS/MS.

[Download Document](#)

H.J. van den Top, A. Gerssen, P. McCarron, H.P. van Egmond. Quantitative determination of marine lipophilic toxins in mussels, oysters and cockles using liquid chromatography-mass spectrometry: inter-laboratory validation study. Food Additives & Contaminants: Part A, 2011, Vol. 28, Iss. 12.

METHOD FOR DETECTION OF OKADAIC ACID TOXINS GROUP IN EDIBLE MOLLUSCS Rev 4

October 2010

Standard Operating Procedures method for the quantitative determination of OA and other carboxylic toxins of the OA group including DTX1, DTX2, DTX3 by a colorimetric phosphatase inhibition assay.

The OkaTest method fulfils the requirements of Chapter III A (4) a, b, and c of Annex III to Regulation (EC) 2074/2005 and can be used as supplementary method to EU-RL LC/MS/MS method only for the detection of Okadaic Acid group toxins OA, DTX1, DTX2, DTX3 including their esters.

The use of OkaTest method is not an alternative to the EU-RL LC/MS/MS method.



LC-MS/MS conditions

Column	Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm	
Flow	0.40 mL / min	
Injection volume	2 μ l	
Column temperature	45 $^{\circ}$ C	
Maximum pressure	15000 psi	
Time (minutes)	% Mobile phase A Ammonia 6.7 mM in water	% Mobile phase B Ammonia 6.7 mM in acetonitrile
initial	70	30
0.50	70	30
6.00	10	90
6.50	0	100
9.50	0	100
9.60	70	30
10.00	70	30



MS-MS fragmentation

Compound	Parent ion (Da)	Fragment ion (Da)	ESI	Cone voltage (V)	Collision voltage (eV)	Dwell (s)
AO-DTX2	803.50	113.00	-	86	56	0.007
AO-DTX2*	803.50	255.20	-	86	46	0.007
DTX1*	817.50	255.20	-	86	48	0.007
DTX1	817.50	113.1	-	86	43	0.007
DTX1	817.50	113.1	-	86	43	0.007

UPLC (Acquity H-class) acoplado a un detector MS/MS detector (XEVO TQS) y a un Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 100 mm column (Waters)

Métodos de detección de toxinas

Toxinas ASP toxins: Domoic acid (DA)

CHAPTER II

AMNESIC SHELLFISH POISON (ASP) DETECTION METHOD

The total content of amnesic shellfish poison (ASP) of edible parts of molluscs (the entire body or any part edible separately) must be detected using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method or any other recognised method.

If the results are challenged, the reference method shall be the HPLC method.

22.12.2005

EN

Official Journal of the European Union

L 338/27

COMMISSION REGULATION (EC) No 2074/2005

of 5 December 2005

laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004

HPLC-UV



EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY
FOR MARINE BIOTOXINS

**EU-Harmonised Standard Operating
Procedure for determination of
domoic acid in shellfish and finfish by
RP-HPLC using UV detection**

Version 1, June 2008

Coordination:

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB)
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)
Estación Marítima S/N
36200 Vigo, Spain
E-mail: eurlmb@mssps.es
<http://www.aesan.mssps.es/en/CRLMB/web/home.shtml>

Métodos de detección de toxinas

Toxinas hidrosolubles: PSP (STX y derivados)

Capítulo I

Método de detección de las toxinas paralizantes de molusco (PSP)

1. El contenido de PSP de las partes comestibles de moluscos (cuerpo entero o parte consumible) deberá ser detectado según el método biológico u otro reconocido internacionalmente. El método Lawrence, HPLC con detector por fluorescencia y oxidación precolumna, podrá utilizarse también como método alternativo como fue publicado (AOAC.OMA.2005.06) (Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish).
2. En caso de discrepancia sobre los resultados, el método de referencia deberá ser el método biológico.



Fines 2017

MBA



HPLC-FLD



22.12.2005

EN

Official Journal of the European Union

L 338/27

COMMISSION REGULATION (EC) No 2074/2005

of 5 December 2005

laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

aecosan
agencia española
de consumo,
seguridad alimentaria y nutrición



**EUROPEAN UNION REFERENCE
LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS**

**EURLMB Standard Operating Procedure for
PSP toxins by Mouse Bioassay**

Version 1, March 2014

Coordination:

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EURLMB)
Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN)
c/ Fonte das Abelleiras, 4 - Edificio CITEXVI - 36310 Vigo, Spain
E-mail: eurlmb@msssi.es
<http://www.aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/home.shtml>

Impacto socio-económico de las HABs

- Salud pública
- Productores e industrias de procesado
- Turismo, restauración
- Costes de monitoreo y gestión



Impacto de las HABs a nivel mundial



JRC TECHNICAL REPORTS

Algal bloom and its economic impact

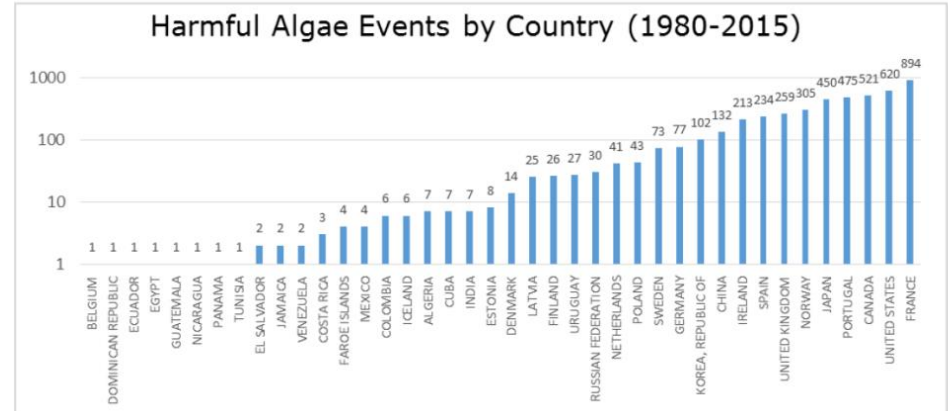


Figure 4: Total Number of Harmful Algae Events reported globally by single countries during the period 1980-2015 to the Harmful Algal Events Dataset (HAEDAT)

Isabella Sanseverino, Diana Conduto, Luca Pozzoli, Srdan Dobricic and Teresa Lettieri

2016



Number of Harmful Algae Events by Syndrome

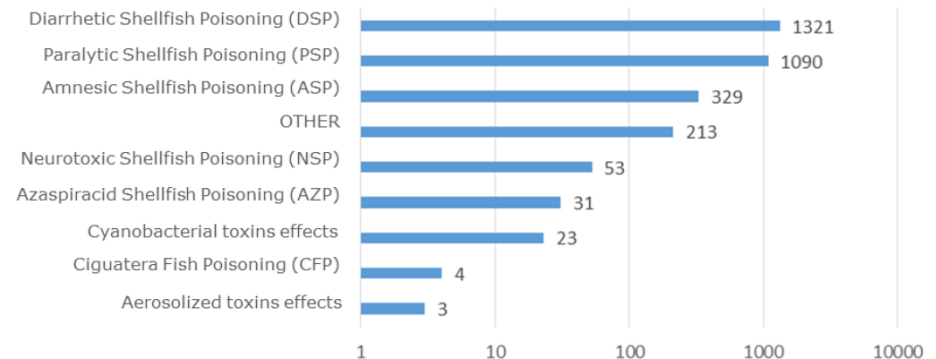
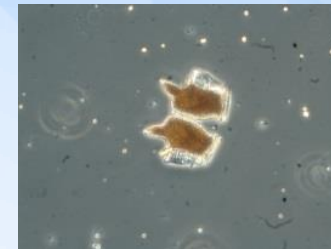
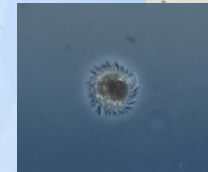


Figure 5: Total Number of Harmful Algae Events by syndrome reported globally during the period 1980-2015 to the Harmful Algal Events Dataset (HAEDAT)

Situación de la producción de mejillones en Galicia



Toxinas lipofílicas



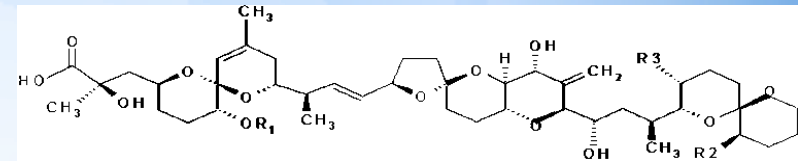
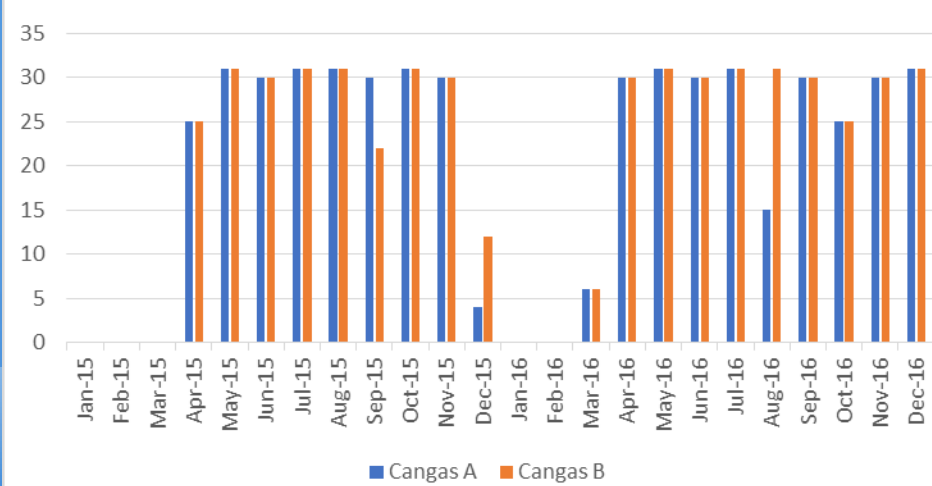
Toxinas amnésicas



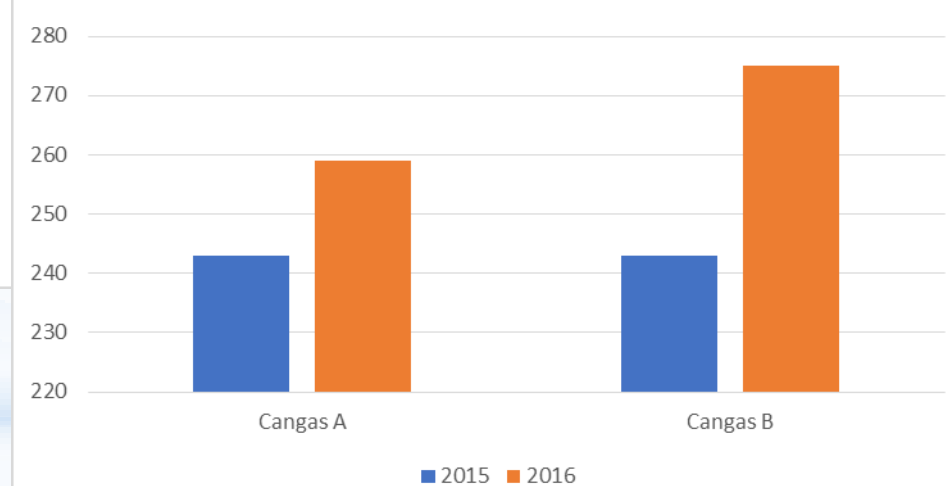
Situación de la producción de mejillones en Galicia

Toxinas del grupo del ácido okadaico

Closure days in 2015-2016



Closure days



Estrategias para disminuir toxinas: alternativas legisladas: PSP

Nº L 15/46

ES

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

20. 1. 96

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

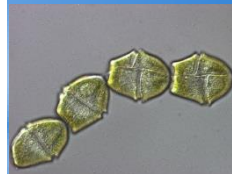
de 18 de enero de 1996

por la que se establecen las condiciones de recogida y transformación de algunos moluscos bivalvos procedente de zonas donde los niveles de toxinas paralizantes superan el límite fijado por la Directiva 91/492/CEE del Consejo

(Texto pertinente a los fines del EEE)

(96/77/CE)

Considerando que para los moluscos bivalvos que pertenecen a la especie *Acanthocardia tuberculatum*, los estudios científicos ponen de manifiesto que un tratamiento térmico adecuado es capaz de garantizar que el tipo de toxina PSP se reduce a un nivel no detectable cuando el nivel inicial de la contaminación no sobrepasa 300 µg para 100 g ;



y otros considerandos....



Pata de mula, langostillo o corruco



Tratamiento térmico aplicable a *Acanthocardia tuberculatum* para reducir la toxina PSP a < de 80 microgramos/100 g

1. Lavado en agua dulce 2 min a 20 ± 2 °C
2. Precocción en agua dulce 3 min a 95 ± 5 °C
3. Separación de la carne de la concha
4. Segundo lavado en agua dulce 30 seg a 20 ± 2 °C
5. Cocción en agua dulce 9 min a 98 ± 3 °C
6. Enfriamiento en agua fría 90 seg
7. Separación de las partes comestibles (pie) de las no comestibles (branquias, vísceras y manto) de forma mecánica y agua a presión
8. Envasado en recipientes herméticos con líquido de cobertura no ácido
9. Esterilización en autoclave a una temperatura mínima de 116 °C durante al menos 51 min (depende del recipiente).



Toxicon 55 (2010) 235–243



Contents lists available at ScienceDirect

Toxiconjournal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes

Antonio Reboreda^a, Jorge Lago^a, María-José Chapela^a, Juan M. Vieites^a, Luis M. Botana^b, Amparo Alfonso^b, Ana G. Cabado^{a,*}

^aMicrobiology and Toxins Area, ANFACO-CECOPESCA, Campus Univ. 16, 36310 Vigo PO, Spain

^bDepartamento de Farmacología, Fac. de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

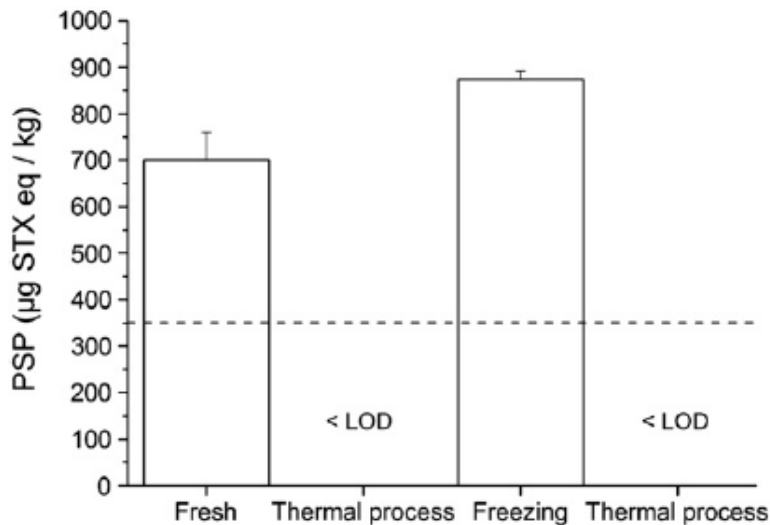


Fig. 4. Effect of thermal processing or/and freezing on PSP toxin levels in clams ($n=4$). Values obtained were $700 \pm 60 \mu\text{g eq STX/kg}$ for fresh clams and $873.3 \pm 17.6 \mu\text{g eq STX/kg}$ for frozen clams. Thermal processing decreased toxicity below the levels of detection.

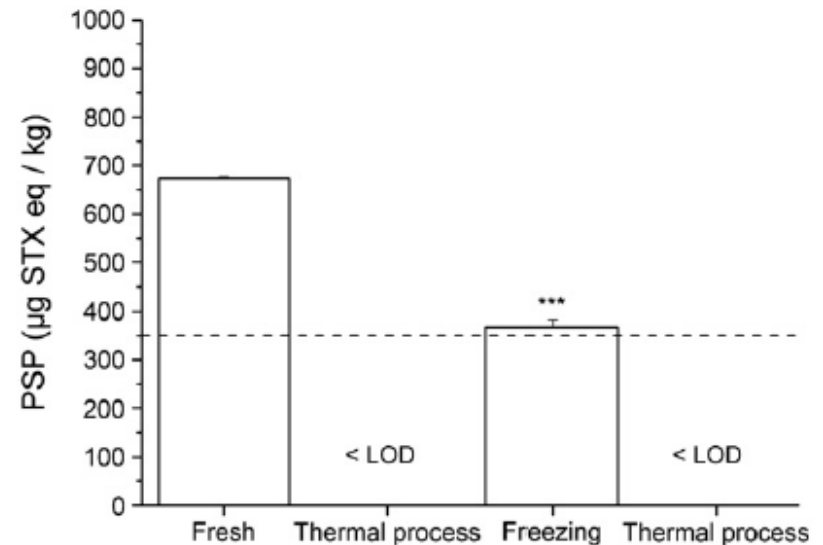


Fig. 5. Effect of thermal processing or/and freezing in PSP toxin levels on cockles ($n=4$). Control PSP concentration was $673.3 \pm 3.3 \mu\text{g eq STX/kg}$. Thawed cockles showed a significant reduction on PSP concentration $366.70 \pm 16.70 \mu\text{g eq STX/kg}$. Thermal processing reduced toxicity below the detection limit.

Estrategias para disminuir toxinas: alternativas legisladas: ASP

16.3.2002

ES

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

L 75/65

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 15 de marzo de 2002

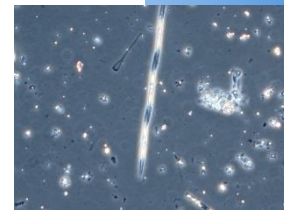
por la que se establecen controles sanitarios especiales para la recolección y transformación de determinados moluscos bivalvos con un nivel de toxina amnésica de molusco (ASP) superior al límite establecido en la Directiva 91/492/CEE del Consejo

[notificada con el número C(2002) 1009]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2002/226/CE)

En cuanto a los moluscos bivalvos de las especies *Pecten maximus* y *Pecten jacobaeus*, diversos estudios científicos han puesto de manifiesto que, con una concentración de DA en cuerpo entero de 20 mg/kg a 250 mg/kg, en determinadas condiciones restrictivas, la concentración de DA en el músculo aductor y las gónadas destinados al consumo humano se encuentra normalmente por debajo del límite de 20 mg/kg.



Transformación de pectínidos para reducir la toxina ASP a < de 20 miligramos/Kg

Recolección: 2 análisis consecutivos, intervalo de 1-7 días, la [DA] en molusco entero < 250 mg/kg, y la [DA] en las partes destinadas al consumo humano < 4,6 mg/kg.

Análisis: cuerpo entero en un homogeneizado de 10 moluscos y partes comestibles en un homogeneizado de 10 partes individuales.

Autorización: AC decide y autoriza el muestreo, al menos, semanal.

Transporte: vehículos precintados bajo la dirección de la AC y enviados de zonas de producción a un establecimiento homologado para ablación del hepatopáncreas.



Cada lote acompañado de
documento de registro





MytiTox



APLICACIÓN INDUSTRIAL DE PROTOCOLOS PARA LA DETOXIFICACIÓN DE MEJILLÓN Y PECTÍNIDOS MEDIANTE EL PROCESADO O LA DEPURACIÓN CON AGENTES MICROENCAPSULADOS. EMPLEO DE LA NANOTECNOLOGÍA PARA ANTICIPARSE A LA CONTAMINACIÓN EN

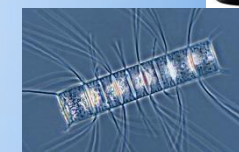
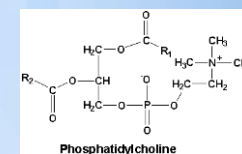
BATEA



Otras estrategias para disminuir toxinas

En: mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), Vieiras (*Pecten maximus*) y volandeiras (*Aequipecten opercularis*)

- Procedimientos *in vivo*
 - NaC
 - Lec
 - Fitoplancton



- Protocolos de laboratorio
 - Liofilización
 - Bacterias



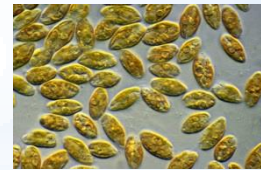
- Prácticas industriales
 - HPP
 - Cambios de pH
 - Tratamientos térmicos



Depuración de moluscos *in vivo* en una depuradora

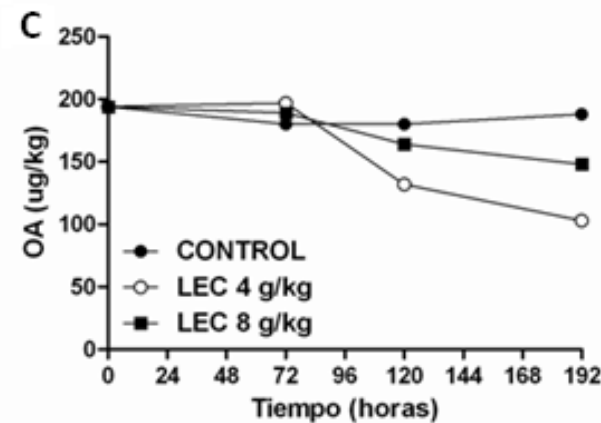
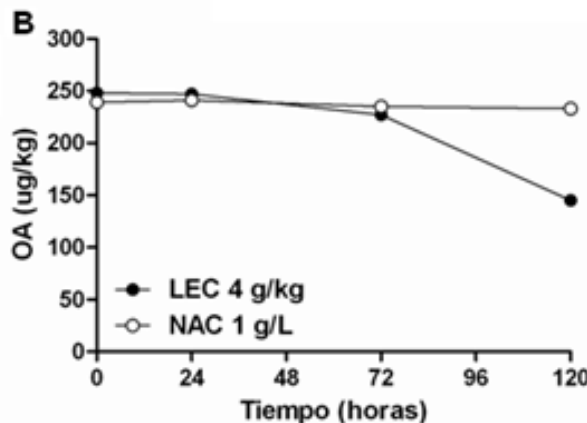
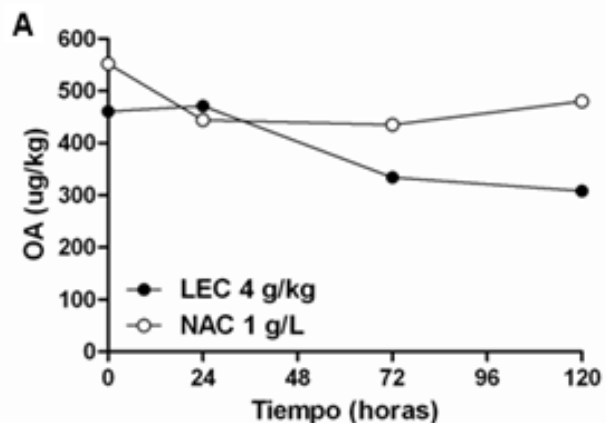
Tratamiento con Lec o Nac

- Acondicionamiento durante horas en circuito abierto
- Tratamiento durante 8 horas en circuito cerrado con el compuesto y/o fitopláncton
- 14 horas de lavado
- Repetir los ciclos

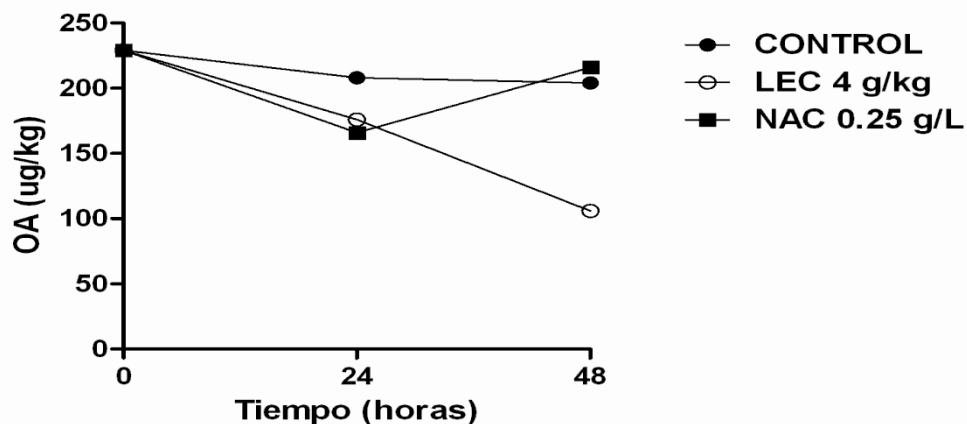


Depuración de moluscos en depuradora

Mytilus galloprovincialis



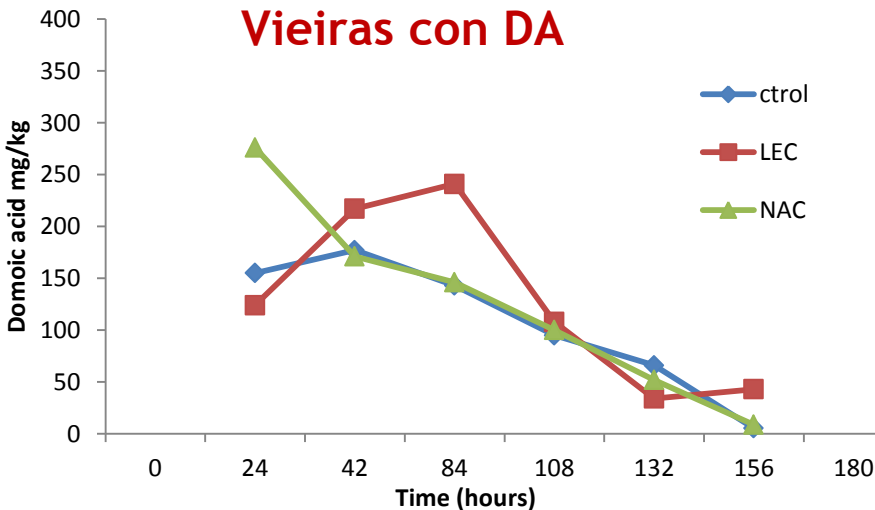
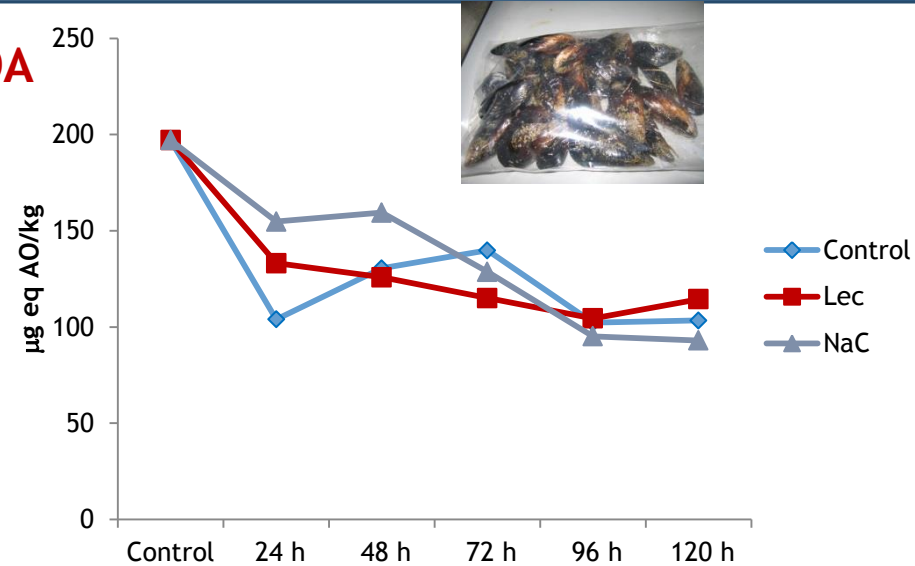
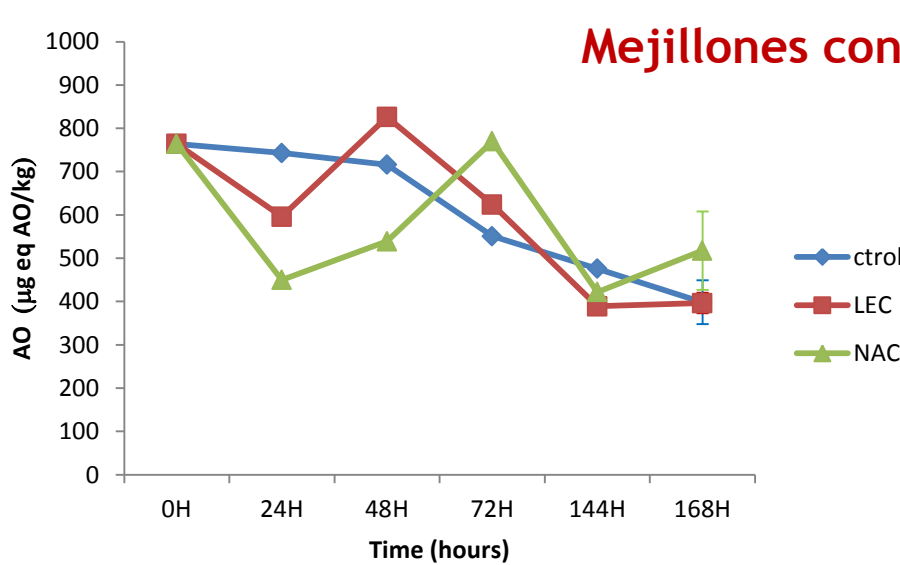
Aequipecten opercularis



Lec (4 g/kg) disminuye el OA al 50 % en mejillones en varios días; en volandeiras en 2 días.



Depuración de moluscos en depuradora



Los mejillones alimentados con microalgas se detoxifican a la misma tasa que los tratados con Lec o Nac.

Se obtiene el mismo resultado en vieiras contaminadas con DA.

Protocolos de laboratorio

Experimentos con *Chromohalobacter israelensis* CECT5287 (Halomonadaceae)

Biodegradation of polyether algal toxins–Isolation of potential marine bacteria. KG Shetty, JV. Huntzicker, KS. Rein, and K Jayachandran. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 2010; 45: 1850–1857.

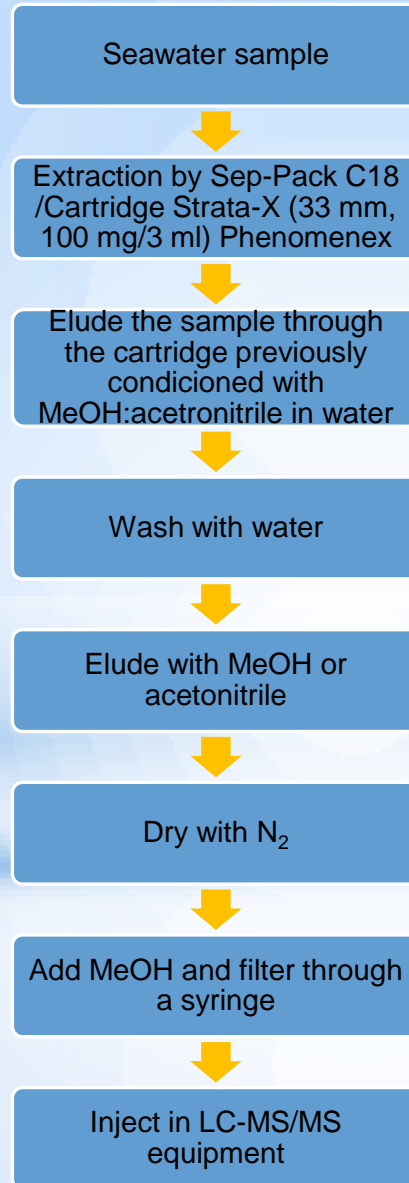
Cultivo de la bacteria en modified Marine broth, pH= 7.5 and 37 °C

Dos tipos de experimentos:

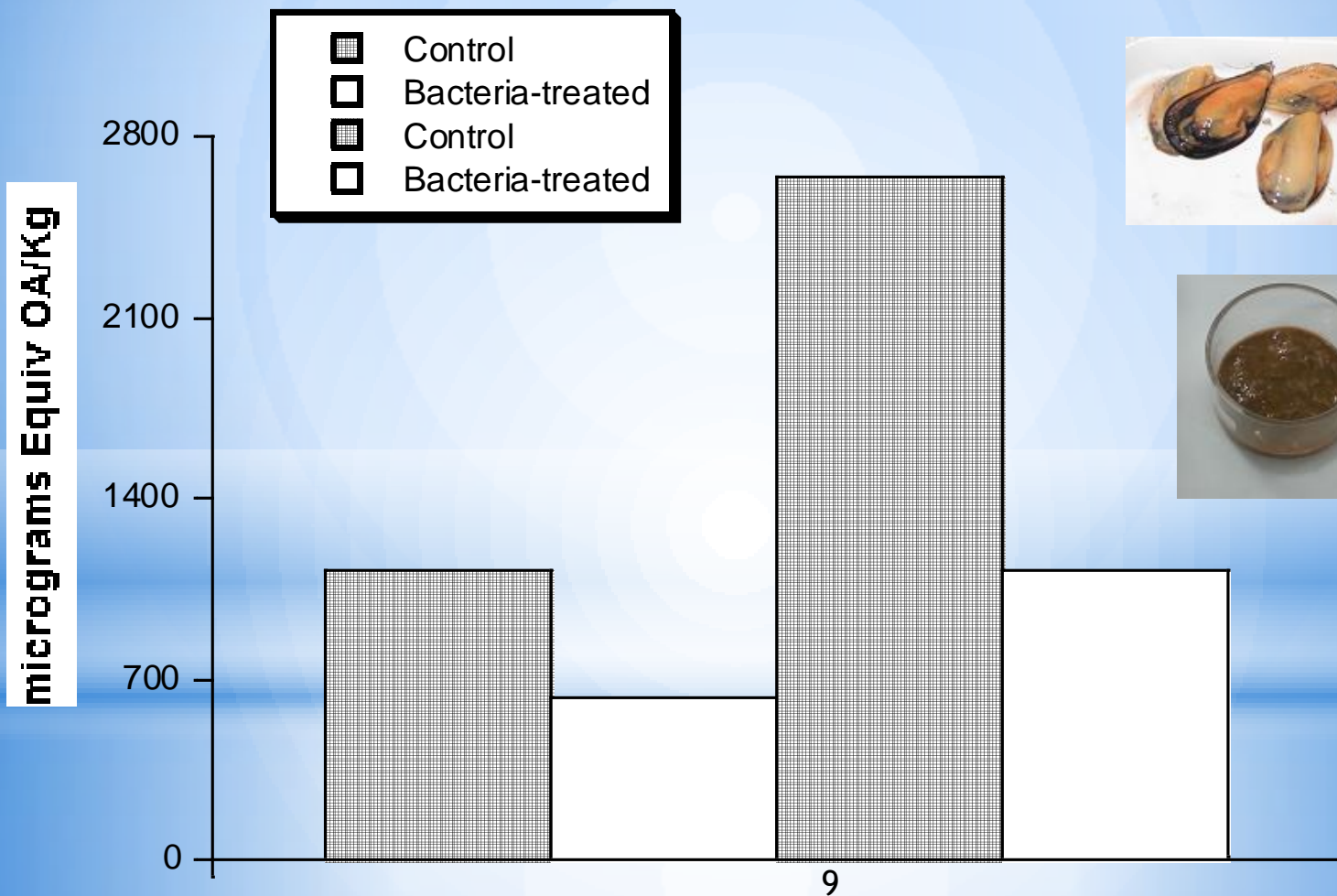
- Usando mejillones tóxicos: 10 g, RT, 7 días
- Usando sólo OA standard: 1000 µg/ml



Análisis de OA en agua: LC-MS/MS

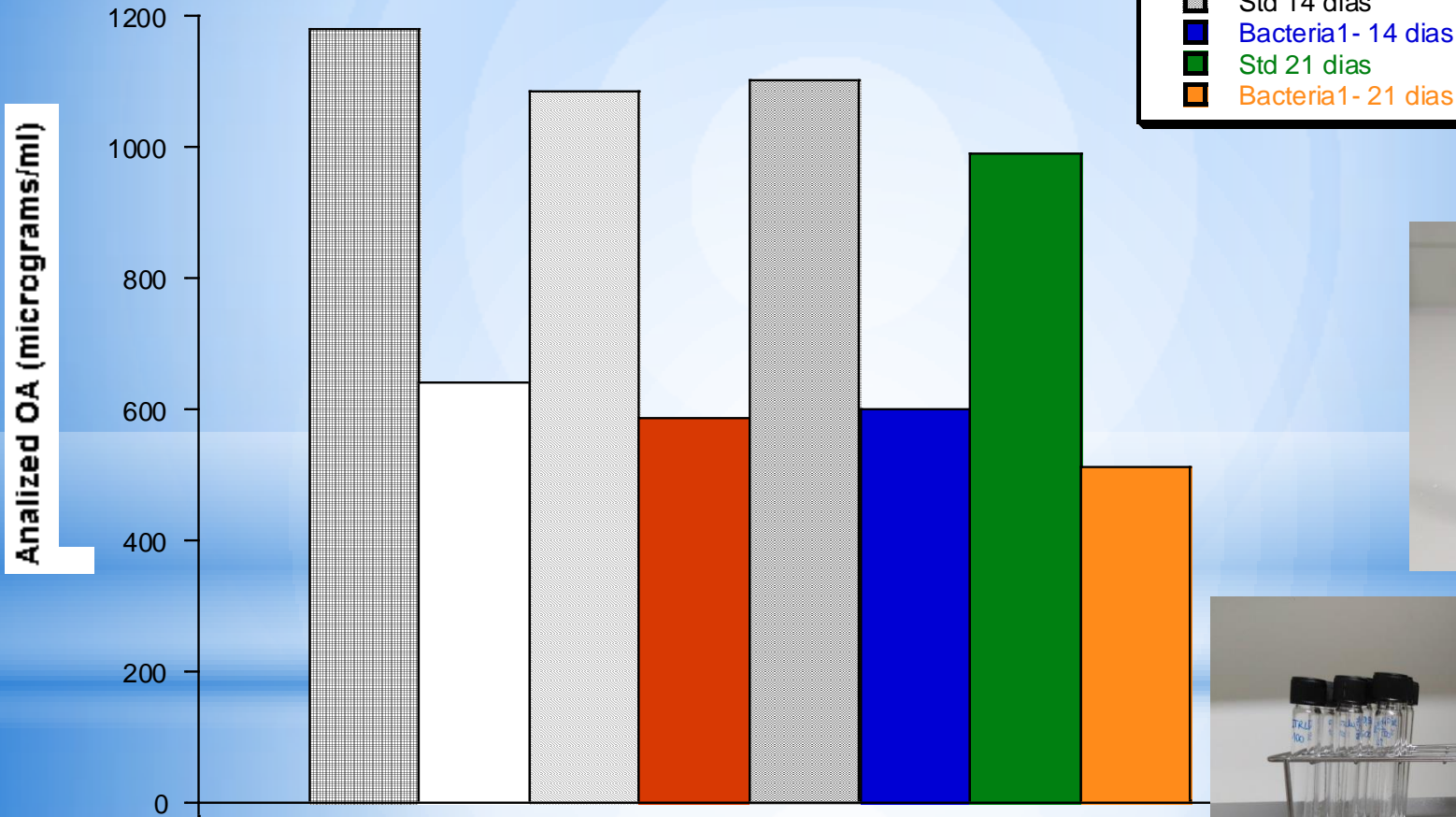


Homogenizado de mejillón



C israelensis: 16×10^9 ufc/ml
Disminuye el OA un 50-75 %.

OA standard

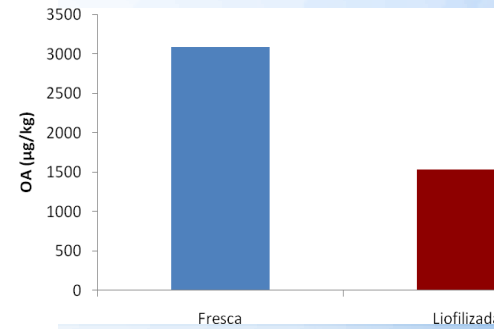
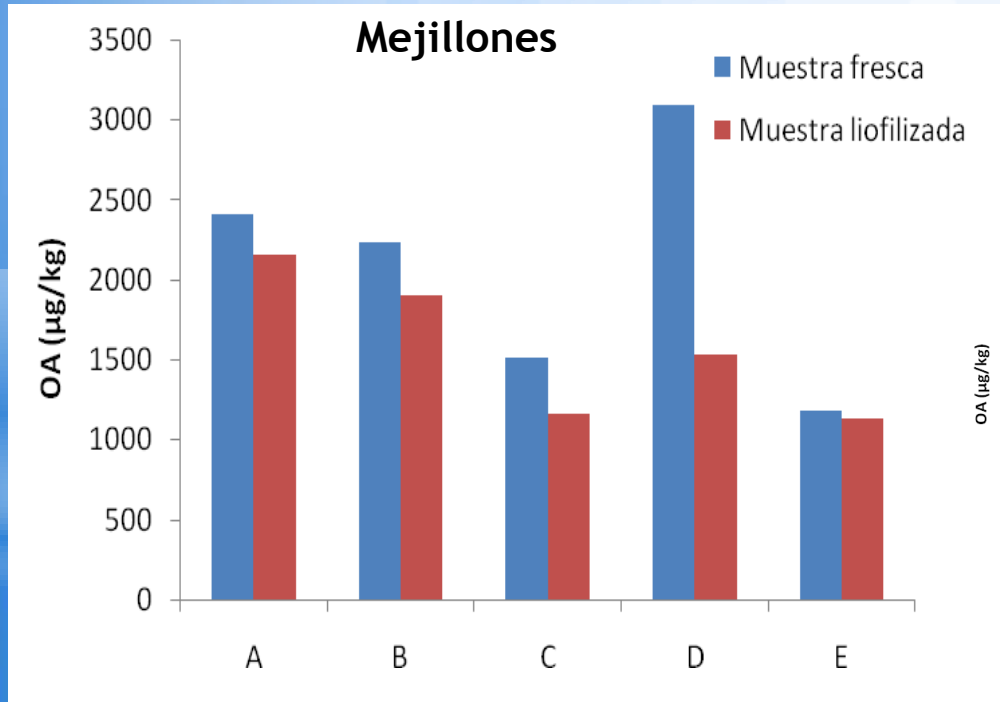


C israelensis: 66×10^7 ufc/ml
Disminuye el OA al 50 % OA.

Protocolos de laboratorio

Freeze-drying o Liofilización

Mejillones y vieiras



Mejillones
Disminuye el OA al 50 %

Distintos lotes de moluscos



Vieiras
Disminuye el DA al 41 %

Procedimientos industriales para disminuir toxinas

High Pressure Processing (HPP)

Técnica de pasteurización en frío, mediante la cual los productos sellados en su envase final, se someten a elevada presión isostática



Diferentes condiciones de HPP
Programa del equipo:

- Presión
- Temperatura
- Pulsos

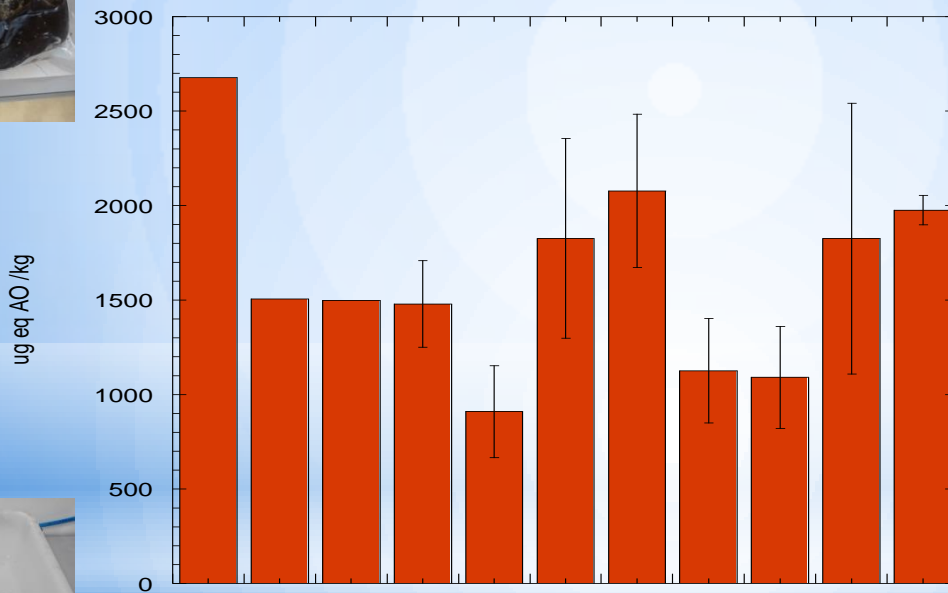
En el molusco

- Apertura previa de valvas
- Salsa de cobertura y pH
- Homogenización



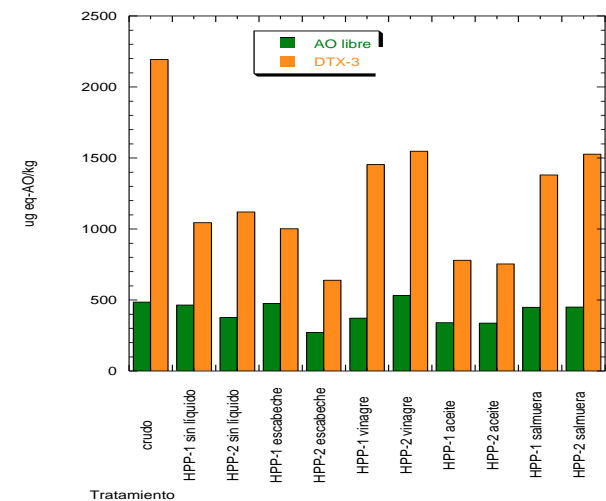
Procedimientos industriales: HPP

HPP en mejillones: OA



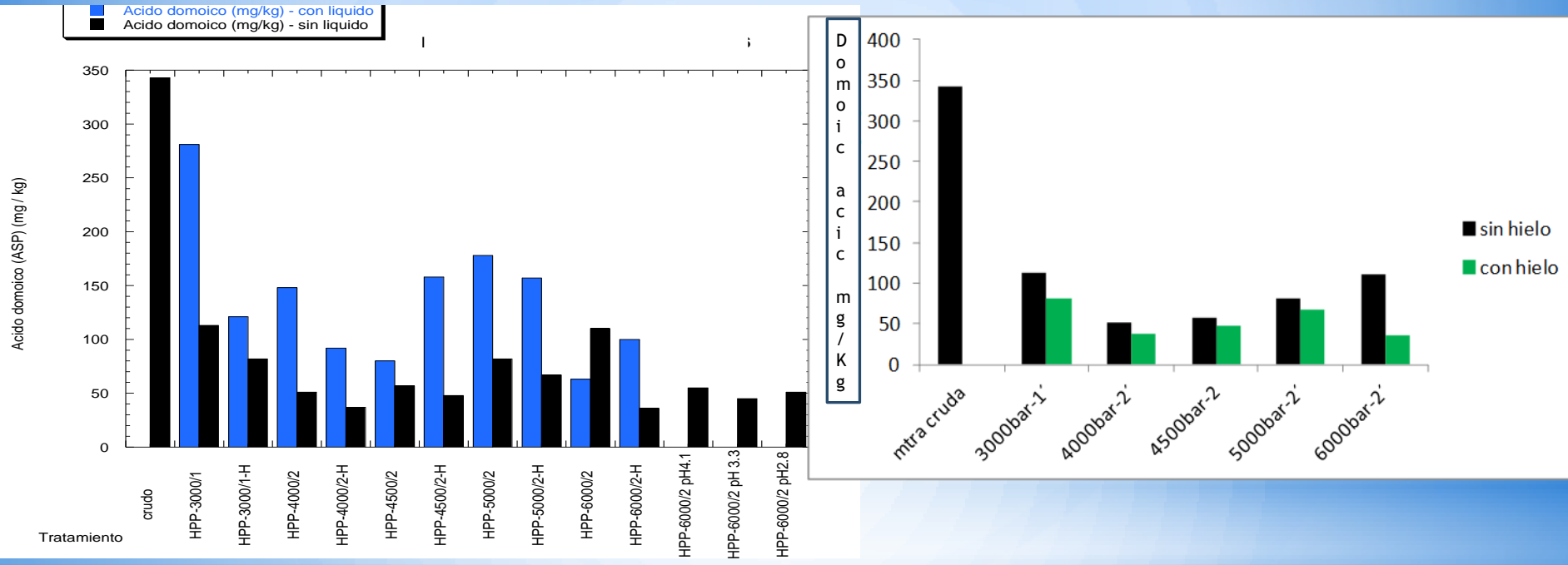
Diferentes condiciones de HPP.

Aumento de peso 35 %
Mayor detoxificación en aceite y escabeche



Procedimientos industriales: HPP

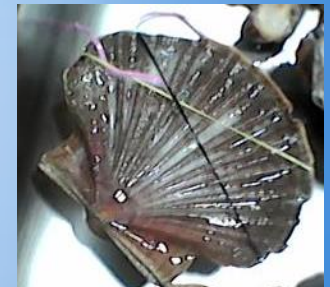
HPP en vieiras: AD



Diferentes condiciones de HPP.

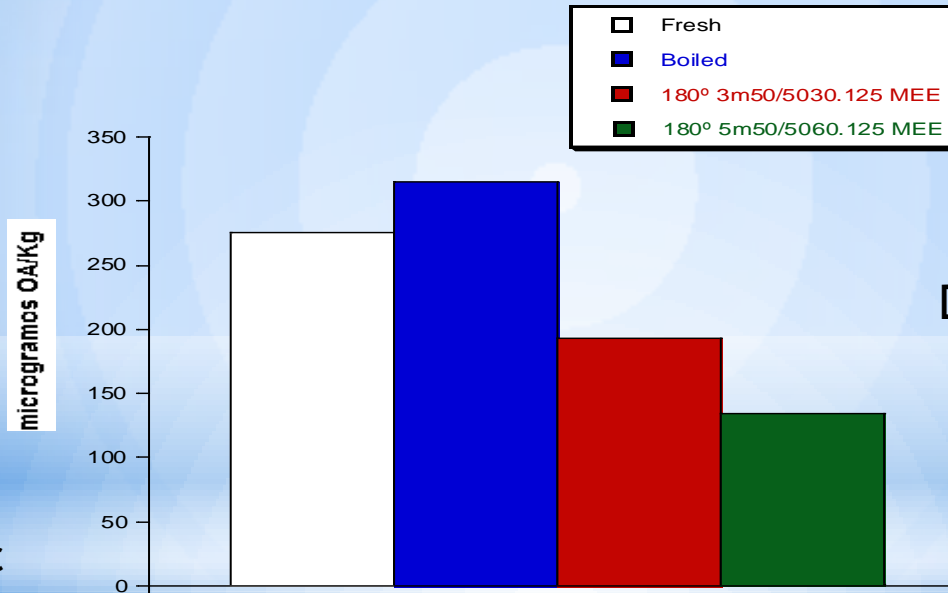
Aumento de peso 24 %

Entre un 70 y un 85 % de detoxificación después de una acidificación



Procedimientos industriales: Acidificación

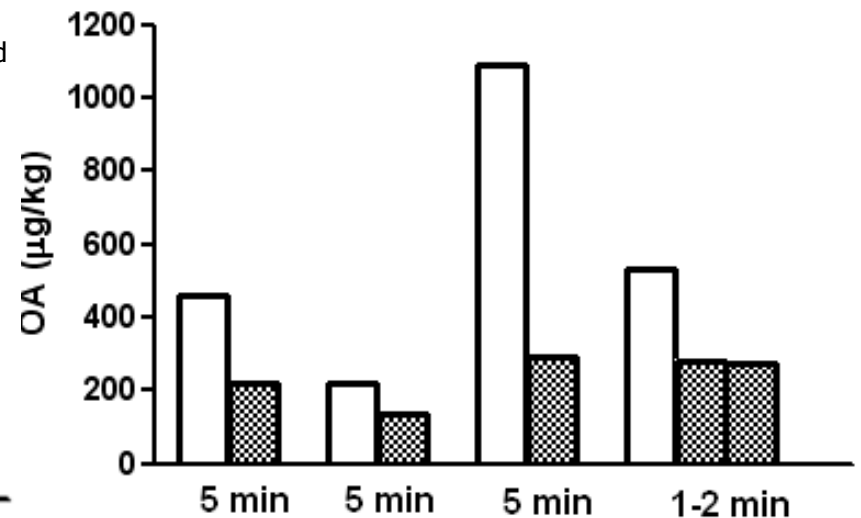
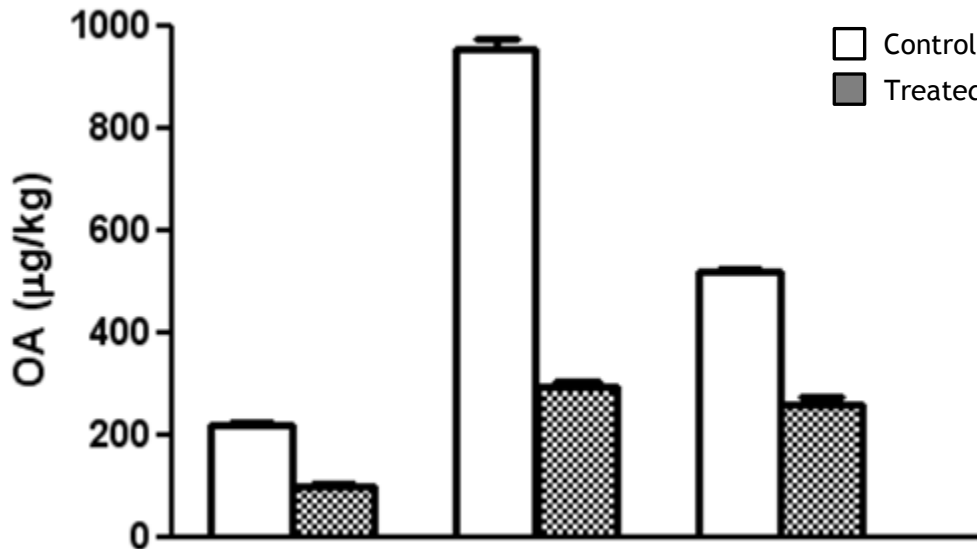
Agua:vinagre
(50:50), fritura a
180 °C, 3/5 min.



Detoxificación 50-60 %

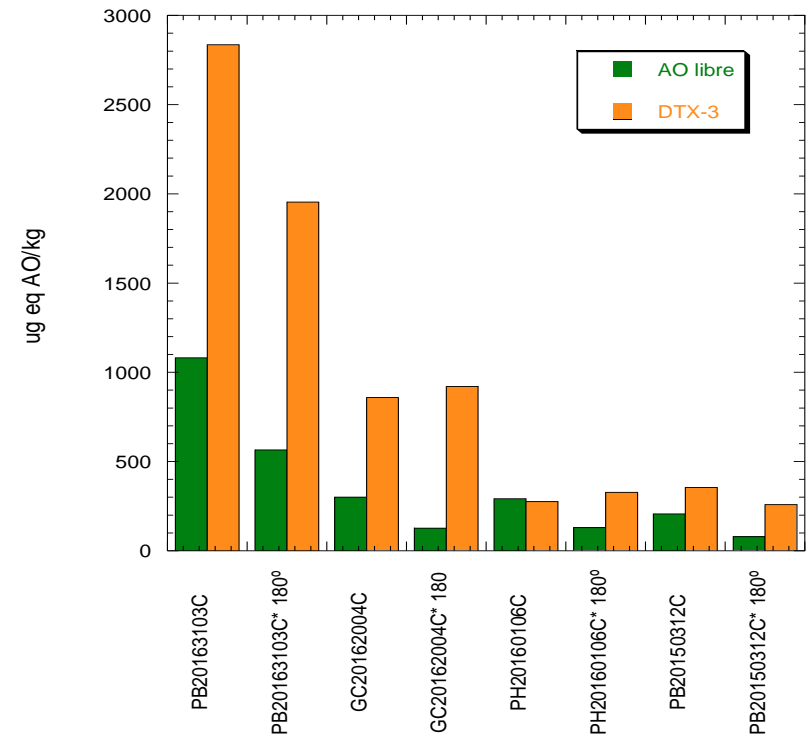
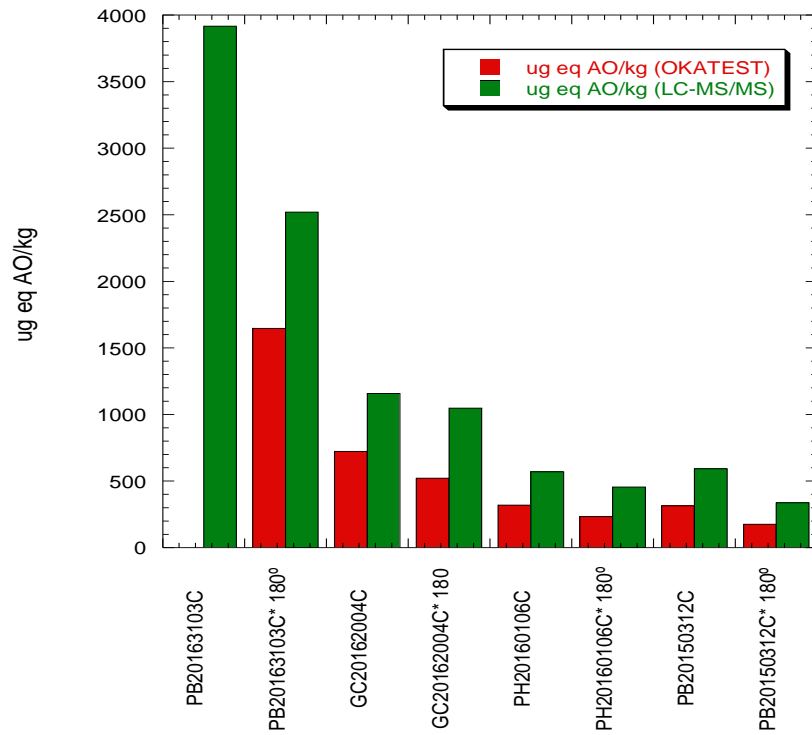
1h 50 °C, y 20 m a 150 °C

1h RT, y 180 °C 1, 2, 5 m



Procedimientos industriales: Acidificación Agua:vinagre (50:50) y fritura a 180 °C, 5 min.

Diferentes lotes de Mejillón



Detoxificación alrededor del 50-60 %

Conclusiones

El procesado industrial permite la reducción de PSP en el corruco a niveles inferiores al límite legal.

La ablación del hepatopáncreas en pectínidos, disminuye [AD] a niveles seguros.

El uso de compuestos como Lec, aumenta la detoxificación en mejillones y en pectínidos contaminados con OA durante la depuración.

El agua limpia o la alimentación con fitopláncton permite la detoxificación en mejillones y vieiras contaminados con OA o DA durante la depuración.

***C israelensis* es capaz de degradar parcialmente el OA de mejillón y de un patrón.**

La liofilización permite una reducción de DA y OA entre el 40-50 %.

HPP disminuye la concentración de OA en mejillones y DA de vieiras, > al 70 %.

La acidificación de los mejillones, fritura y esterilización, permite obtener porcentajes de detoxificación cercanos al 60 %.

An aerial photograph of a large reservoir. In the background, a suspension bridge spans across the water. The water is a deep blue-green color, and the surrounding hills are covered in dense green forest. In the foreground, there is a small island with a few buildings and trees, connected to the mainland by a small bridge. The text "Gracias por su atención" is overlaid in the center of the image.

Gracias por su atención