

Institut Ramon Berenguer IV
Carrer Mestre Suñé, 1-37
Amposta (Tarragona)



AVALUACIÓ DE LA PRESENCIA DE TETRODOTOXINA EN MOSTRES DE MARISC DEL DELTA DE L'EBRE

Treball de Recerca de Batxillerat

Autora: Martina Tolós

Tutor (RBIV): Josep Albiol

Tutora (IRTA): Maria Rambla-Alegre

Curs escolar: 2021-2022

Àrea d'investigació: Química

Agraïments

Aquest treball ha estat possible gràcies a diverses persones i institucions, que anomeno a continuació: Mònica Campàs, investigadora de l'IRTA i cap del laboratori de biosensors, per guiar-me en la redacció del treball; Jorge Diogène, investigador de l'IRTA i cap del programa AMiC, que m'ha permès fer l'estada al seu grup de recerca; Maria Rambla, investigadora de l'IRTA i cap del laboratori de química analítica, i Lourdes Barreiro, estudiant de doctorat, que m'han explicat tots els protocols i el funcionament del laboratori; Greta Gaiani i Sandra Leonardo, que m'han ensenyat a treballar en assaigs bioquímics i biosensors. També altres investigadors i tècnics de l'IRTA, que m'han ensenyat metodologies d'altres laboratoris. Per últim, però no menys important, Josep Albiol, per acceptar la tutoria del meu treball i donar-me consell.

Avaluació de la presència de tetrodotoxina en mostres de marisc del Delta de l'Ebre

La tetrodotoxina (TTX) és una toxina marina molt potent que, tot i que normalment es troba en peixos globus, recentment s'ha detectat en marisc de diversos països, especialment a Europa. L'objectiu d'aquest treball de recerca és avaluar la possible presència de TTX en mostres de marisc de les badies del Delta de l'Ebre (Alfacs i Fangar). Per tal d'aconseguir-ho, s'ha posat a punt un protocol per extreure aquesta toxina del marisc (musclo i ostró) i detectar-la mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS). Amb aquesta metodologia s'ha obtingut un límit de quantificació (LOQ) d'1.6 µg/kg de TTX en musclo i de 3.1 µg/kg en ostró, i el percentatge de recuperació ha estat del 47.7% per a musclo i 29.5% per a ostró. L'aplicació del mètode a l'anàlisi de mostres naturals de marisc de les badies del Delta de l'Ebre ha demostrat que cap dels musclos i ostrons contenen TTX. Per tant, actualment, la seguretat alimentària està garantida i la salut del consumidor està protegida.

Paraules clau

Tetrodotoxina (TTX), cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS), musclo, ostró, Badia dels Alfacs, Badia del Fangar, Delta de l'Ebre.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
2. HIPÒTESI.....	2
3. OBJECTIUS	3
4. ESTAT DE L'ART	4
4.1 Les toxines marines.....	4
4.2 La tetrodotoxina.....	9
4.2.1 Generalitats de la tetrodotoxina	9
4.2.2 Expansió de la tetrodotoxina en marisc d'Europa	14
4.2.3 Mètodes de detecció de la tetrodotoxina	16
5. MATERIALS I MÈTODES	18
5.1 Reactius.....	18
5.2 Equips.....	19
5.3 Mostres	20
5.4 Extracció i purificació.....	24
5.5 Anàlisi.....	26
6. RESULTATS I DISCUSSIÓ	30
7. CONCLUSIONS	38
8. REFERÈNCIES	40
9. ÍNDIX D'ABREVIATURES	43

10. ÍNDEX DE FIGURES46

11. ÍNDEX DE TAULES48

1. Introducció

L'avaluació de tetrodotoxina (TTX) en mostres de marisc del Delta de l'Ebre té rellevància perquè busca garantir la seguretat alimentària de les persones consumidores. Aquesta toxina, si es troba en la dosi suficient, pot intoxicar als consumidors de marisc i causar greus símptomes, fins i tot la mort. És important valorar i protegir la salut de la població. També cal garantir la feina i fiabilitat dels mariscadors i restauradors, i a la vegada assegurar la reputació del sector turístic. A més, és un tema innovador científicament, ja que al Delta encara no s'ha investigat a fons sobre ell, i actualment la presència de TTX en marisc és un risc emergent a tota Europa.

Per a dur a terme aquesta recerca, he decidit anar durant el mes de juliol a l'IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) per a realitzar els experiments necessaris i adquirir experiència de laboratori. Allà m'he familiaritzat amb tot el material de laboratori, ja que aquest any, degut a la situació de pandèmia causada pel virus COVID-19, no hem pogut realitzar moltes pràctiques als laboratoris de l'institut. A més a més, personalment tinc un gran interès per la investigació, sobretot quan està enfocada a la química, i això m'ha impulsat a realitzar aquest treball.

2. Hipòtesi

La pregunta que s'ha respost amb l'elaboració del treball és: Ha arribat la TTX al marisc del Delta de l'Ebre?

Per tant, la hipòtesi que s'ha formulat és: Donat que aquests últims anys la presència de TTX en marisc s'està expandint per tota Europa, és possible que hagi arribat al Delta de l'Ebre, encara que sigui a baixes concentracions. Per tant, jo crec que s'ha d'analitzar el marisc de la zona per tal de saber si aquest risc alimentari és real i, en cas que ho sigui, ser capaços de controlar-lo.

3. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball ha sigut avaluar la possible presència de TTX en mostres de marisc de les badies del Delta de l'Ebre mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS).

Els objectius específics d'aquest treball són:

- ✓ Establir un protocol per detectar l'estàndard de TTX en solvent mitjançant LC-MS/MS i construir la corba de calibratge.
- ✓ Establir un protocol per extreure i purificar TTX de mostres de marisc (musclo i ostró).
- ✓ Establir un protocol per detectar l'estàndard de TTX en extractes de marisc (musclo i ostró) mitjançant LC-MS/MS i construir les corbes de calibratge.
- ✓ Avaluar el percentatge de recuperació de TTX durant l'extracció i purificació mitjançant el dopatge d'homogenats de musclo i ostró al nivell suggerit per l'Agència Europea de Seguretat Alimentària ("European Food Safety Authority", EFSA), que és de 44 µg/kg.
- ✓ Analitzar la presència de TTX en mostres naturals de marisc de les badies del Delta de l'Ebre i avaluar-ne el risc potencial.

4. Introducció

4.1 Les toxines marines

Les toxines marines són compostos actius generalment produïts per microalgues que habiten en mars i oceans. Aquestes poden ser ingerides per organismes marins, transferir-se a través de les xarxes tròfiques i arribar als animals i al consumidor humà, produint greus intoxicacions (Fig. 1).

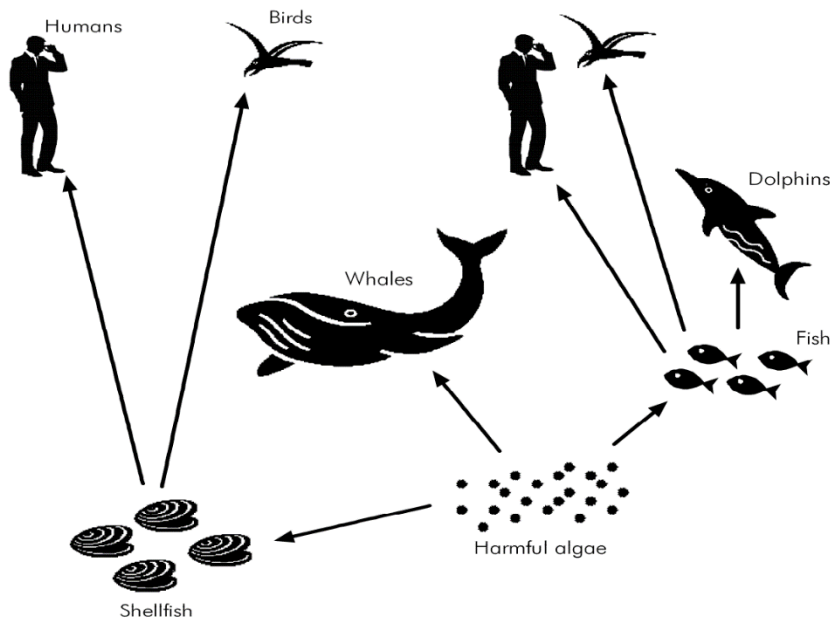


Figura 1: Xarxes tròfiques per les quals es poden transmetre les toxines marines (Gerssen et al., 2010).

Segons els símptomes que provoquen, podem dividir les toxines en 3 grups principals:

- Toxines amnèsiques ("Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) toxins"): són produïdes per les diatomees del gènere *Pseudo-nitzschia*. Actuen sobre els canals de sodi de les cèl·lules, deixant-los oberts, fent entrar així una gran quantitat de ions i despolaritzant la membrana cel·lular. Aquest fet provoca en les persones desordres gastrointestinals, nàusees, vòmits, dolor abdominal i diarrea. També mal de cap, marejos i pèrdua de

memòria a curt termini. La toxina ASP de referència és l'àcid domoic ("domoic acid (DA)") (Fig. 2).

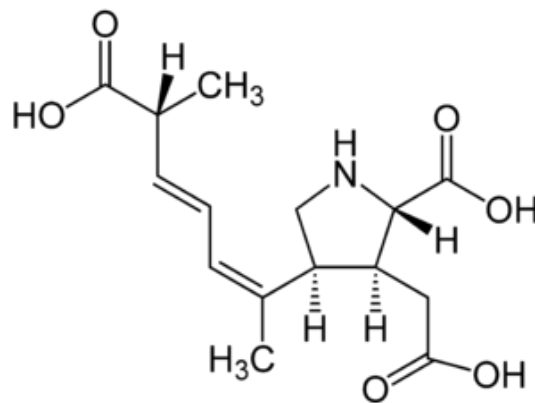


Figura 2: Estructura de l'àcid domoic (DA).

- Toxines paralitzants ("Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins"): són produïdes per dinoflagel·lats del gènere *Alexandrium*. Actuen sobre els canals de sodi de les cèl·lules deixant-los tancats, evitant així l'entrada de ions de sodi. Quan s'ingereixen aquestes toxines, els nervis motors són afectats, causant dificultats respiratòries i altres dificultats musculars. Aquest fet provoca en les persones formigueig en zones properes a la boca, també sensació de punxades a les puntes dels dits, mal de cap, marejos i nàusees. Fins i tot s'ha comprovat que també poden generar ceguera temporal. La toxina PSP de referència és la saxitoxina ("saxitoxin (STX)") (Fig. 3).

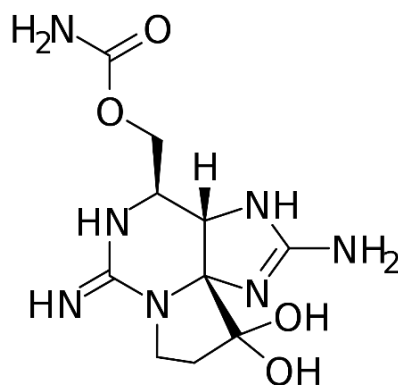


Figura 3: Estructura de la saxitoxina (STX).

- Toxines lipofíliques (“Lipophilic Shellfish Poisoning (LSP) toxins”): dins d’aquest grup podem observar diferents subgrups, entre ells les toxines diarreiques (“Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP) toxins”) i les no diarreiques. Les toxines DSP inclouen l’àcid okadaic (“okadaic acid (OA)”) (Fig. 4) i les dinofisistoxines (“dinophysistoxins (DTXs)”). Dins de les no diarreiques, trobem els azaspiràcids (“Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP) toxins”) (Fig. 5), les pectenotoxines (PTXs) (Fig. 6) i les yessotoxines (YTXs) (Fig. 7). Les toxines DSP són produïdes per dinoflagel·lats dels gèneres *Dinophysis* i *Prorocentrum*. Les toxines AZP són produïdes per dinoflagel·lats del gènere *Azadinium*. Les PTXs, com l’OA i les DTXs, són produïdes per dinoflagel·lats del gènere *Dinophysis*. Les YTXs són produïdes per dinoflagel·lats del gènere *Protoceratium*. Els símptomes més comuns en humans són desordres gastrointestinals, vòmits, diarrea, dolor abdominal, nàusees, malestar general, reducció ràpida de la freqüència respiratòria i alteracions en la conducta cardíaca. A més de les toxines mencionades, dins del grup de les toxines LSP s’han trobat les imines cíliques, que inclouen les gimnodimines (“gymnodimines (GYMs)”) (Fig. 8), els espiròlids (“spiroïdes (SPXs)”) (Fig. 9) i les pinnatoxines (“pinnatoxins (PnTXs)”) (Fig. 10).

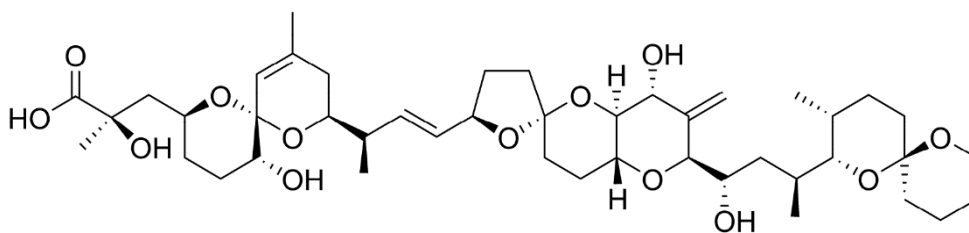


Figura 4: Estructura de l'àcid okadaic (OA).

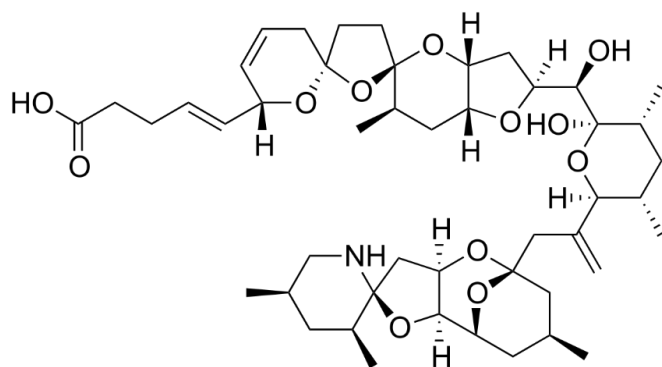


Figura 5: Estructura de l'azaspiracid-1 (AZA-1).

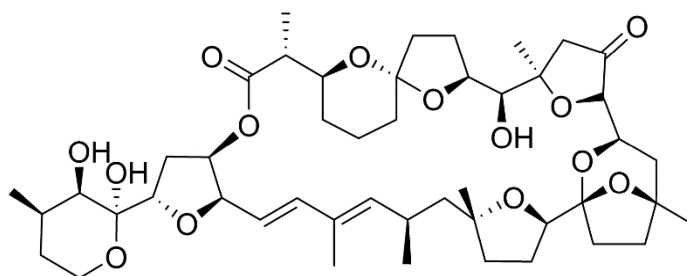


Figura 6: Estructura de la pectenotoxina-2 (PTX-2).

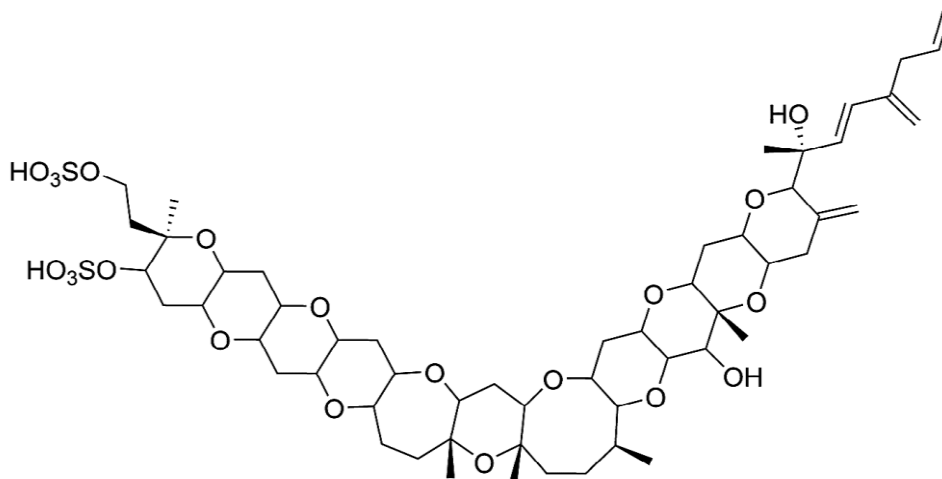


Figura 7: Estructura de la yessotoxina (YTX).

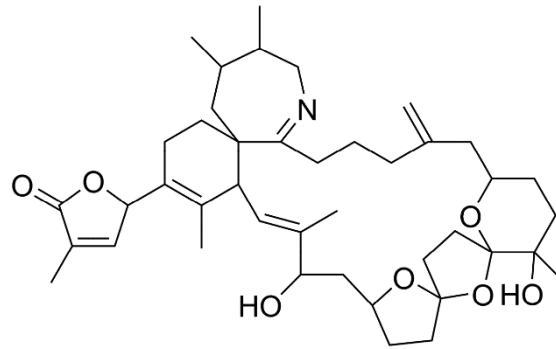


Figura 8: Estructura de la gimnodimina A (GYM-A).

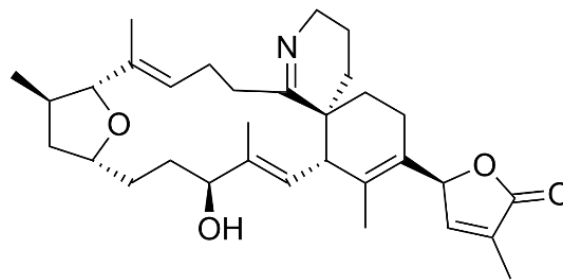


Figura 9: Estructura del 13-desmetil espiròlid C (13-desMe-SPX-C).

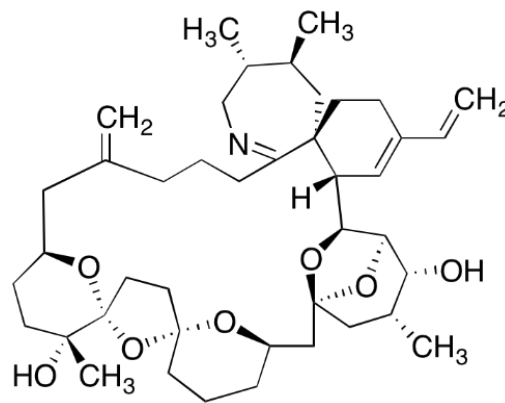


Figura 10: Estructura de la pinnatoxina (PnTX G).

- Toxines neurològiques (“Neurologic Shellfish Poisoning (NSP) toxins”): són produïdes per dinoflagel·lats del gènere *Gymnodinium*. En humans, provoquen una paràlisi lleugera dels membres, símptomes gastrointestinals i broncospasme. També s’ha observat que afecten

alguns animals marins, com foques i lleons marins. Les toxines NSP són les del grup de les brevetoxines (“Brevetoxin (PbTx-2)”) (Fig. 11).

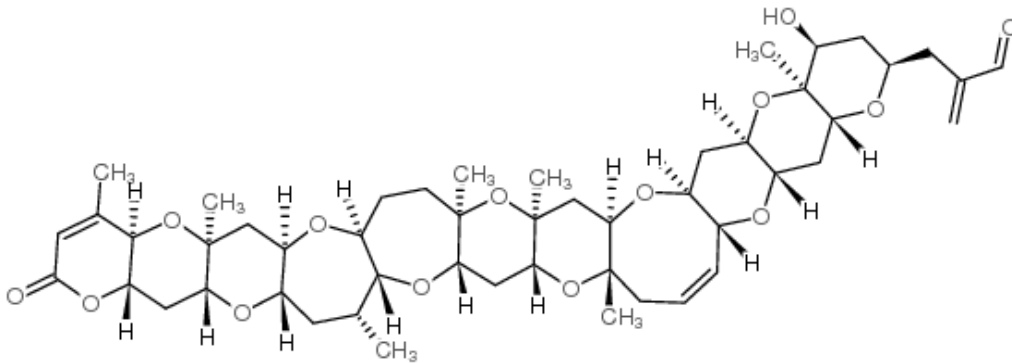


Figura 11: Estructura de la brevetoxina (PbTx-2).

4.2 La tetrodotoxina

4.2.1 Generalitats de la tetrodotoxina

La TTX és un tipus de una neurotoxina que, a diferència de totes les anteriors, no és produïda per microalgues, sinó per bacteris. Aquesta és la raó per la qual la TTX està fora de la classificació anterior. Va ser descoberta el 1909 pel Dr. Yoshizumi Tahara, que la va localitzar als ovaris d'un peix globus (Bane et al., 2014). És responsable d'un gran nombre d'intoxicacions i morts per consum d'aquest tipus peix, sobretot al Japó, on aquesta delícia culinària es coneix com a “fugu”. Generalment la TTX es concentra al fetge, ovaris i pell dels peixos, és per això que les persones responsables de preparar el menjar s'han d'assegurar d'eliminar amb molta precaució aquestes parts.

A més de trobar-se en peixos globus, la TTX també s'ha trobat en altres espècies, fins i tot terrestres. Entre elles podem distingir bivalves, gastròpodes, tritons, crancs, granotes, llimacs marins, estrelles de mar, pops i cucs (Bane et al., 2014). És possible que la TTX s'hagi estès entre altres espècies degut a la xarxa tròfica i les relacions alimentàries que hi ha entre elles.

Com s'ha dit prèviament, en el cas dels peixos globus, la TTX és produïda per bacteris que habiten dins d'aquests organismes. Com en una mena de simbiosi,

el peix té aquests bacteris, els quals el doten amb toxicitat enfront els seus depredadors. Hi ha almenys cinc tipus diferents de bacteris que en produeixen, entre ells *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Actinomyces* i *Aeromonas*.

Generalment, la TTX es forma a partir d'una molècula de D-glucosa, sofreix un procés amb moltes reaccions, entre 23 i 67 (Fig. 12). Una vegada produïda, la TTX s'emmagatzema al fetge dels peixos globus. A partir d'allà, en els peixos mascles tendeix a escampar-se per la pell, mentre que en els peixos femelles es dirigeix sobretot cap a les gònades (els ovaris).

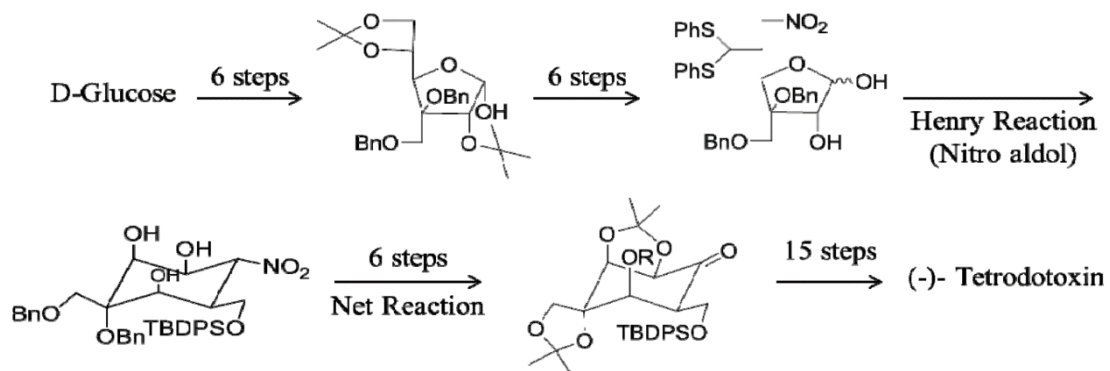


Figura 12: Formació de la tetrodotoxina (TTX) a partir d'una molècula de D-glucosa (Bane et al., 2014).

La TTX és una molècula orgànica i heterocíclica (Fig. 13 i 14). També és un zwitterió, és a dir, té un grup carregat positivament i un de carregat negativament, de manera que pot actuar com una base o com un àcid, depenent del pH del medi en què es troba. La seva fórmula molecular és $C_{11}H_{17}N_3O_8$, i el seu pes molecular és de 319.27 g/mol.

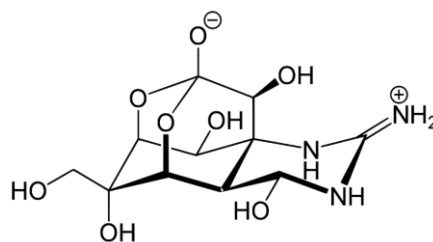


Figura 13: Estructura de la tetrodotoxina (TTX).

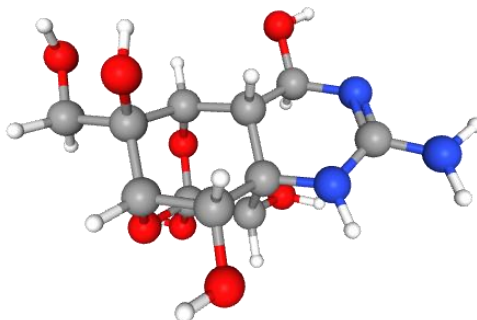
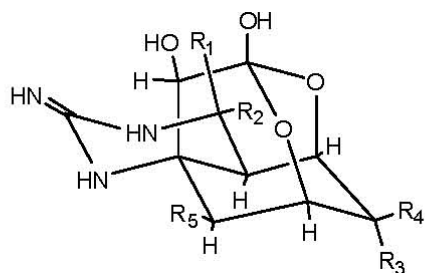


Figura 14: Representació 3D de la tetrodotoxina (TTX) (PubChem).

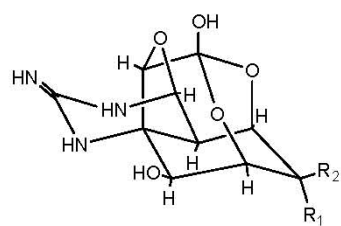
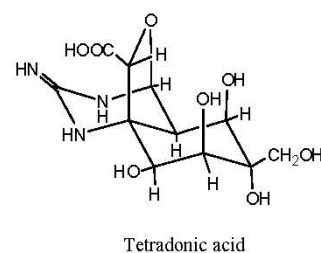
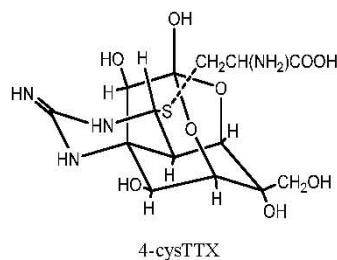
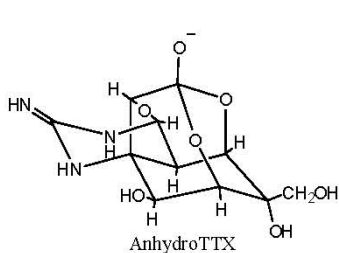
La TTX és hidrofílica, que significa soluble en aigua, i també termoestable, és a dir, resistent a les altes temperatures. És per això que al cuinar el peix, la toxina no es degrada. És soluble en àcid acètic diluït, una mica en aigua, alcohol sec i èter, però insoluble en altres dissolvents orgànics.

Segons els radicals de la molècula i la seva disposició, podem obtenir diferents “versions” de la toxina. Cada “versió” s’anomena anàleg o congènere, i n’hi ha un total de 26, tots ells diferents (Fig. 15). Alguns són més tòxics i alguns altres menys. Per exemple, els anàlegs “deoxi” són menys tòxics que la TTX original, i els anàlegs “hidroxi” ho són més que tots dos. Segons el nombre i disposició dels grups hidroxil, l’anàleg tindrà més toxicitat o menys. S’ha estudiat que aquests grups hidroxil, sobretot els dels carbonis 6 i 11, tenen un paper important en la interacció amb els canals de sodi, sent aquests els principals responsables de la mort cel·lular. Els hidroxils dels carbonis 4, 9 i 10 també tenen aquesta característica, tot i que no són tant importants.

Avaluació de la presència de tetrodotoxina en mostres de marisc del Delta de l'Ebre



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	OH
4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	OH
6-epiTTX	H	OH	CH ₂ OH	OH	OH
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	OH
6,11-dideoxyTTX	H	OH	H	CH ₃	OH
8,11-dideoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	H
11-oxoTTX	H	OH	OH	CH(OH) ₂	OH
11-norTTX-6,6-diol	H	OH	OH	OH	OH
11-norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	OH
11-norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	OH
Chiriquitoxin	H	OH	OH	CH(OH)CH(NH ₃ ⁺)COO ⁻	OH
TTX-8-O-hemisuccinate	H	OH	OH	CH ₂ OH	OOC(CH ₂) ₂ COO ⁻
TTX-11-carboxylic acid	H	OH	OH	COO ⁻	OH



	R ₁	R ₂
4,9-anhydroTTX	OH	CH ₂ OH
6-epi-4,9-anhydroTTX	CH ₂ OH	OH

Avaluació de la presència de tetrodotoxina en mostres de marisc del Delta de l'Ebre

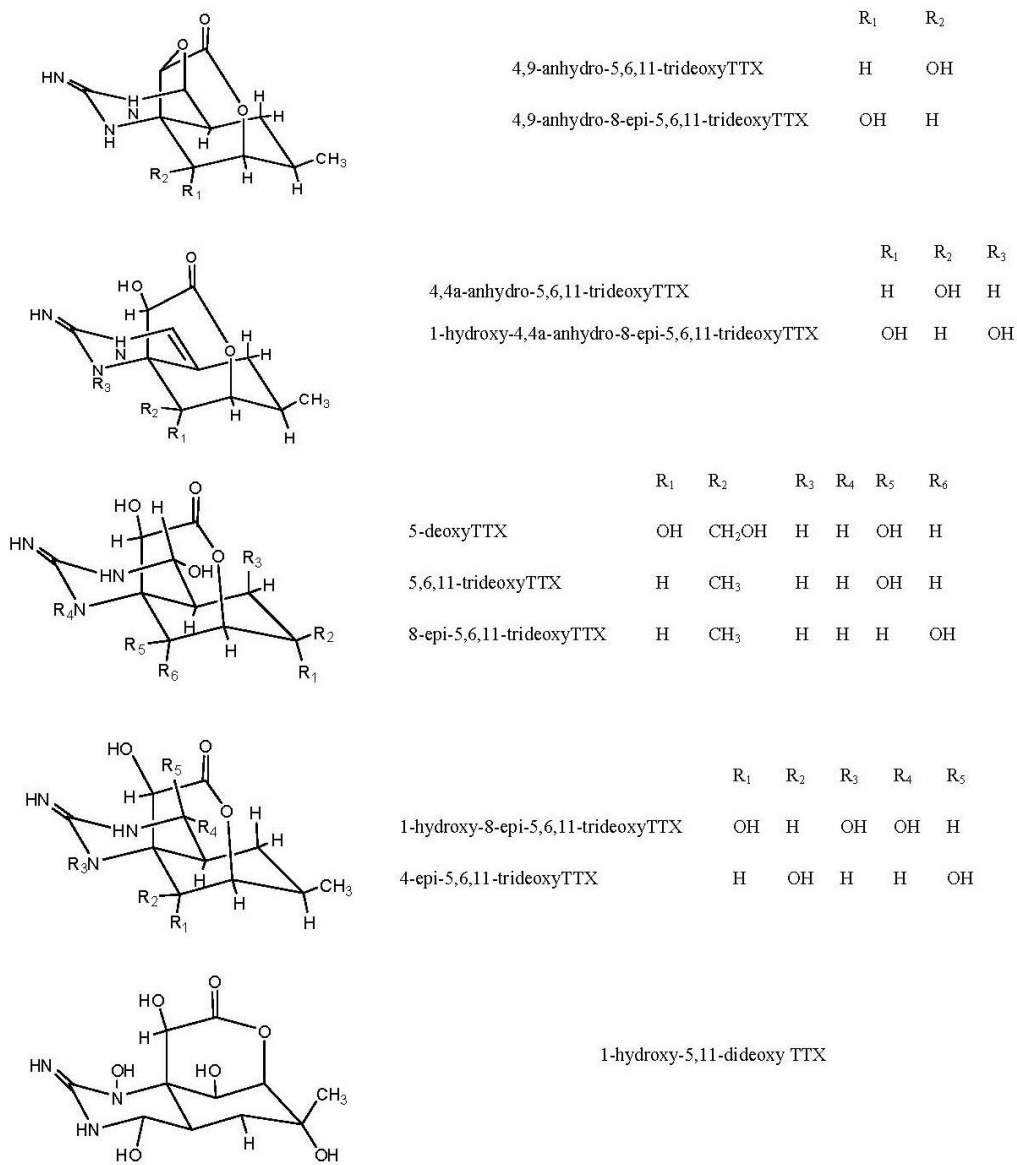


Figura 15: Diferents anàlegs de la tetrodotoxina (TTX) segons els seus radicals (Bane et al., 2014).

Com s'ha comentat, a nivell cel·lular la TTX actua sobre els canals de sodi dependents de voltatge (uns petits orificis que permeten als ions de sodi traspasar la membrana cel·lular sense despesa d'energia), bloquejant-los i inhibint la transmissió neuromuscular, causant un efecte paralitzant als músculs (a l'igual que la STX). Com a mecanisme de defensa, la bomba de sodi-potassi de les cèl·lules s'activa, fent entrar ions de sodi a l'interior per a que la cèl·lula pugui continuar funcionant. Quan aquesta ha gastat gran part de la seva energia en aquest procés de transport actiu i no pot seguir fent-ho, es col·lapsa i es mor.

Que ho faci més ràpidament o menys depèn del tipus d'anàleg de la toxina la qual infecta a la cèl·lula, és a dir, de la toxicitat, i també de la seva quantitat.

La intoxicació d'una persona pot ser ràpida, de 10 a 45 minuts, o lenta, de 3 a 6 hores. La mort pot arribar en un mínim de 20 minuts o en un màxim de 24 hores, però sol fer-ho entre les primeres 4-8 hores. Les persones que sobreviuen les primeres 24 hores solen recuperar-se sense efectes crònics, però els símptomes i la recuperació poden durar uns quants dies. La intensitat dels símptomes depèn de la dosi de TTX ingerida, l'estat d'hidratació i les condicions de salut de la persona (sent més greu si la persona presenta alguna malaltia crònica o és d'edat avançada).

Els primers símptomes que poden aparèixer són picor, paràlisi i formigueig als llavis i llengua, parestèsia de les extremitats (anomalia de la percepció de les sensacions), mal de cap, diaforesi (sudoració intensa), marejos, entumiment, salivació, nàusees, vòmits, diarrea, dolor abdominal, dificultat per moure's, malestar i dificultats de parla. Com a símptomes secundaris, que no són tan freqüents, es pot observar una extensió de la paràlisi a altres membres, dificultats per respirar, falta d'alè, arrítmia cardíaca, hipotensió, dilatació de les pupil·les, convulsions, coma, parada respiratòria, fins arribar a la mort.

També cal destacar que no existeix cap antídoto per a la TTX. En alguns casos, d'intoxicació, s'ha proporcionat un fàrmac anticolinesteràsic, tot i que no se n'ha assegurat la seva eficàcia. Aquest medicament ajuda a les sinapsis neuronals, fent una acció contrària a la de la TTX. El rentat gàstric i l'ús de carboni actiu en els pacients són bones opcions per a reduir els símptomes en cas de que la persona hagi ingerit el peix fa menys de mitja hora (Fundación iO, 2020).

4.2.2 Expansió de la tetrodotoxina en marisc d'Europa

Respecte a la presència de TTX en marisc, en un principi era característica del Japó, però amb els pas dels anys s'ha anat escampant per les costes de l'oceà Pacífic, l'oceà Índic, l'oceà Atlàntic i, finalment, el mar Mediterrani (Fig. 16). Es diu que la seva propagació pels oceans pot ser deguda al canvi climàtic, que ha donat lloc a l'augment de temperatures de l'aigua. També és possible que s'hagi escampat a causa de la globalització del comerç. A Europa, la primera intoxicació

deguda al consum de marisc contaminat amb TTX es va produir a Espanya el 2007, per uns cargols de mar que provenien de Portugal (Rodríguez et al., 2008). Des d'aleshores, la TTX s'ha trobat en marisc de diferents parts d'Europa, com Grècia (Vlavis et al., 2015), Anglaterra (Turner et al., 2015), Holanda (Gerssen et al., 2018), Espanya (Leão et al., 2018), Itàlia (Dell'Aversano et al., 2019) i França (Hort et al., 2020) (tot i que la Figura 16 no inclou aquestes tres últimes referències, algunes pel fet de ser posteriors).

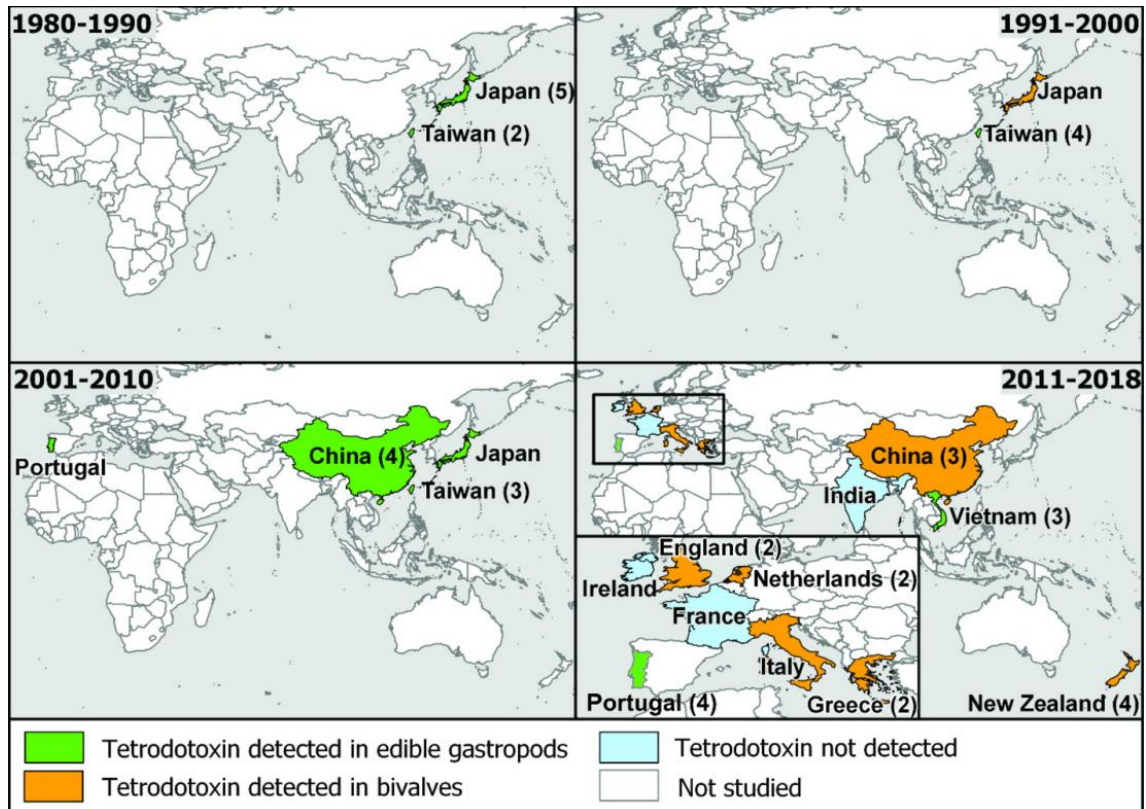


Figura 16: Detecció de TTX en bivalves i gastròpodes comestibles en les quatre últimes dècades. Els números entre parèntesis signifiquen el nombre d'espècies diferents en les que s'ha detectat la toxina (Biessy et al., 2019).

La trobada de TTX en bivalves comestibles ha provocat certes preocupacions pels riscos que en pot tenir el seu consum, motivant la investigació a tot el planeta. Tot i que normalment la concentració de TTX en marisc sol ser d'unes 1000 vegades menys que en peix globus (així ha estat a Europa, per exemple), igualment s'ha de tenir en compte el risc potencial, ja que es consumeix una gran quantitat de marisc arreu el món. A més a més, la TTX és molt tòxica i la dosi

mínima que ocasiona símptomes d'intoxicació és molt baixa comparada amb altres tipus de toxines.

4.2.3 Mètodes de detecció de tetrodotoxina

A Europa, la presència de TTX en marisc no està regulada. No obstant, en un informe recent, l'EFSA ha conclòs que concentracions de 44 µg de TTX/kg de marisc, basant-se en una porció de 400 g, no dona lloc a efectes adversos en humans (EFSA, 2017). Per tant, els mètodes de detecció que s'estan desenvolupant tenen com a objectiu ser capaços de detectar com a mínim aquesta concentració de TTX.

El primers mètodes de detecció de TTX que es van desenvolupar van consistir en un bioassaig amb ratolins ("Mouse BioAssay" (MBA)) i amb rates ("Rat BioAssay" (RBA)). Aquests mètodes es basen en la toxicitat de la TTX i donen una resposta global per a tots els anàlegs tòxics. El procediment implica injectar mostres de toxina a aquests animals i, per a calcular la toxicitat, es mesura el temps en què aquests tarden en morir. No és un mètode específic per a la TTX (es poden produir falsos positius degut a la presència d'altres compostos, com per exemple la STX). També causa alguns enfrontaments ètics, cosa que desaconsella el seu ús.

Un altre mètode que es fa servir és un assaig de citotoxicitat basat en cèl·lules neuro-2A (N2a). Aquest assaig es basa en l'activitat de la TTX i els seus anàlegs sobre els canals de sodi dependents de voltatge. En l'assaig cel·lular, en presència d'ouabaïna (bloquejador de la bomba de sodi/potassi ATPasa) i veratridina (activador dels canals de sodi dependents de voltatge), les cèl·lules es moren. Quan s'afegeix la TTX, aquesta bloqueja els canals de sodi dependents de voltatge, amb la qual cosa s'aconsegueix recuperar la viabilitat de les cèl·lules. Aquest mètode requereix aproximadament dos dies d'experimentació i, a més a més, no podem assegurar que la toxina que hi ha allà sigui la TTX i no la STX o qualsevol altre compost que tingui la mateixa acció bloquejadora. Tot i això, l'assaig només requereix un estàndard de referència i és bastant sensible.

També s'han desenvolupat immunoassaigs (assaigs amb anticossos), que permeten detectar la toxina amb més especificitat, com els assaigs immunosorbents enllaçats a enzims ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA)). Aquests assaigs es basen en l'afinitat dels anticossos per l'estructura de la TTX. Cal dir que l'anticòs pot no reconèixer amb la mateixa afinitat tots els anàlegs de TTX. L'afinitat per a cadascun dels anàlegs s'anomena reactivitat creuada. Fins i tot ara ja podem trobar kits ELISA al mercat, tècnica que no requereix grans equips de laboratori. Els immunoassaigs també poden adoptar formats tipus flux lateral, és a dir, tires reactives del mateix estil que els tests d'embaràs o els test d'antígens de la COVID-19. També s'han desenvolupat biosensors òptics i electroquímics.

El primer mètode de detecció química de la TTX va consistir en un assaig cromatografia líquida acoblada a detecció per fluorescència (LC-FLD). En treballs més recents, la fluorescència s'ha reemplaçat per l'espectrometria de masses, també acoblada a la cromatografia líquida (LC-MS), ja que és més específica i millora la detecció d'alguns anàlegs que tenen poca intensitat de fluorescència. La LC-MS/MS sembla ser la més efectiva i específica. De fet, l'EFSA la recomana per a identificar i quantificar la toxina amb els seus anàlegs. En l'espectròmetre de masses, les mostres, en petites quantitats, s'introdueixen a l'equip. Quan passen a la cambra de ionització, la mostra és travessada per un feix d'electrons, i perden electrons i/o elements. En aquest bombardeig, es pot produir una fragmentació de la molècula, cosa que dona lloc a fragments carregats positivament. Aquest ions són els que passaran per un camp magnètic, el qual provocarà la desviació dels ions, impactaran al receptor, i així s'obté l'espectre. Els pics més alts correspondran a ions més grans; els que hauran perdut menys electrons i altres elements (Caamaño & Obach, 2018). L'anàlisi de la TTX també pot ser realitzada per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS), tot i que és molt menys habitual. Els mètodes d'anàlisi instrumentals (tots els citats en aquest paràgraf) es basen en el reconeixement estructural. En aquest cas, calen diversos estàndards de referència i les respostes són individuals.

5. Materials i mètodes

Els materials i mètodes que s'han fet servir són els que estableix el protocol del Laboratori de Biotoxines Marines de Referència a la Unió Europea (“European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins” (EURLMB)) per a la determinació de TTX (EURLMB, 2017). A més, també s'han incorporat algunes modificacions d'articles científics (HILIC, 2017) (Turner et al., 2017) per tal d'escollir els paràmetres experimentals més apropiats segons els nostres equips.

5.1 Reactius

S'han fet servir els següents productes primaris per tal de formar les solucions per a l'extracció i purificació de la TTX i les fases mòbils per a l'anàlisi per LC-MS/MS:

- Acetonitril (ACN)
- Metanol (MeOH)
- Àcid fòrmic (FA) al 98-100%
- Àcid acètic glacial (HAc)
- Hidròxid d'amoni (NH₃) al 25%
- Aigua desionitzada (Milli-Q)

Tots aquests compostos han de contenir la paraula “LC-MS” a la seva etiqueta, que fa referència a la puresa necessària per tal de realitzar anàlisis d'aquest tipus en els equips corresponents.

Per a l'extracció i purificació de TTX de les mostres de marisc, hem preparat les següents solucions:

- Solució A: 1% v/v HAc: 1000 mL aigua Milli-Q + 10 mL HAc.
- Solució B: 20% v/v ACN amb 1% v/v HAc: 200 mL ACN + 800 mL aigua Milli-Q + 10 mL HAc.
- Solució C: 0.025% v/v NH₃: 500 mL aigua Milli-Q + 500 µL 25% NH₃.

- Solució D: 80% v/v ACN amb 0.25% v/v HAc: 80 mL ACN + 20 mL aigua Milli-Q + 250 µL HAc.

Per a l'anàlisi de TTX mitjançant LC-MS/MS, hem preparat les fases mòbils següents:

- Fase mòbil A1: 500 mL aigua Milli-Q + 75 µL FA + 300 µL NH₃. Mesclar correctament.
- Fase mòbil B1: 700 mL ACN + 300 mL aigua Milli-Q + 100 µL FA. Mesclar correctament.
- Fase mòbil A2 (per a l'apagat de la màquina): 200 mL aigua Milli-Q + 1 mL FA. Mesclar correctament.
- Fase mòbil B2: MeOH.

Abans de col·locar-les a l'interior de l'instrument, hem de filtrar les fases A1 i B1 al buit per a eliminar impureses que puguin interferir en els resultats. A més a més, s'han de preparar diàriament per tal que la màquina funcioni correctament.

5.2 Equips

Els equips utilitzats per als experiments són els que es detallen a continuació.

Per a l'extracció i purificació de TTX de les mostres de marisc:

- Tubs de polipropilè per a la centrifugadora de 50 mL i de 1.5 mL
- Micropipetes de diferents volums
- Vòrtex
- Bany d'aigua bullint
- Centrífuga
- Micro-centrifugadora
- Cartutxos amb filtres de carboni actiu (Supelco Supelclean ENVI-Carb 250 mg/3 mL)
- Mòdul d'extracció de fase sòlida connectat a una bomba de buit

Per a l'anàlisi de TTX mitjançant LC-MS/MS:

- Vials de polipropilè de 700 µL (autosamplers)
- Columna per a l'instrument d'espectrometria (Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide HILIC Column 130 Å 1.7 µm, 2.1 x 150 mm)
- Sistema de cromatografia líquida acoblat a un detector d'espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS)

5.3 Mostres

S'han analitzat diverses mostres de musclo i ostró, totes elles recol·lectades a les badies del Delta de l'Ebre al 2020 per l'IRTA (Fig. 17-21).

Per a la primera fase (corba de calibratge i avaluació de recuperació), s'han fet servir 6 mostres:

- 3 mostres de musclos sense TTX (1 com a blanc i 2 per a dopar)
- 3 mostres d'ostrons sense TTX (1 com a blanc i 2 per a dopar)

Taula 1: Dades de les mostres utilitzades com a blancs i per a dopar.

Espècie	Codi de la mostra	Badia	Data de mostreig
Musclo	FM09-040121	Fangar	4/1/2021
Ostró	FO42-040121	Fangar	4/1/2021

I per a la segona fase (anàlisi de TTX), s'han fet servir 16 mostres:

- 10 mostres de musclos de l'estiu de 2020 (4 de la Badia dels Alfacs i 6 de la Badia del Fangar)
- 6 mostres d'ostrons de l'estiu de 2020 (totes de la Badia del Fangar)

Taula 2: Dades de les mostres analitzades.

Espècie	Codi de la mostra	Badia	Data de mostreig
Musclo	AM28-060720	Alfacs	6/7/2020
Musclo	FM24-060720	Fangar	6/7/2020
Musclo	AM54-130720	Alfacs	13/7/2020
Musclo	FM13-130720	Fangar	13/7/2020
Musclo	AM33-270720	Alfacs	27/7/2020
Musclo	AM88-270720	Alfacs	27/7/2020
Musclo	FM10-270720	Fangar	27/7/2020
Musclo	FM16-270720	Fangar	27/7/2020
Musclo	FM32-100820	Fangar	10/8/2020
Musclo	FM37-100820	Fangar	10/8/2020
Ostró	FO29-240820	Fangar	24/8/2020
Ostró	FO33-240820	Fangar	24/8/2020
Ostró	FO34-010920	Fangar	1/9/2020
Ostró	FO67-010920	Fangar	1/9/2020
Ostró	FO29-090920	Fangar	9/9/2020
Ostró	FO34-090920	Fangar	9/9/2020

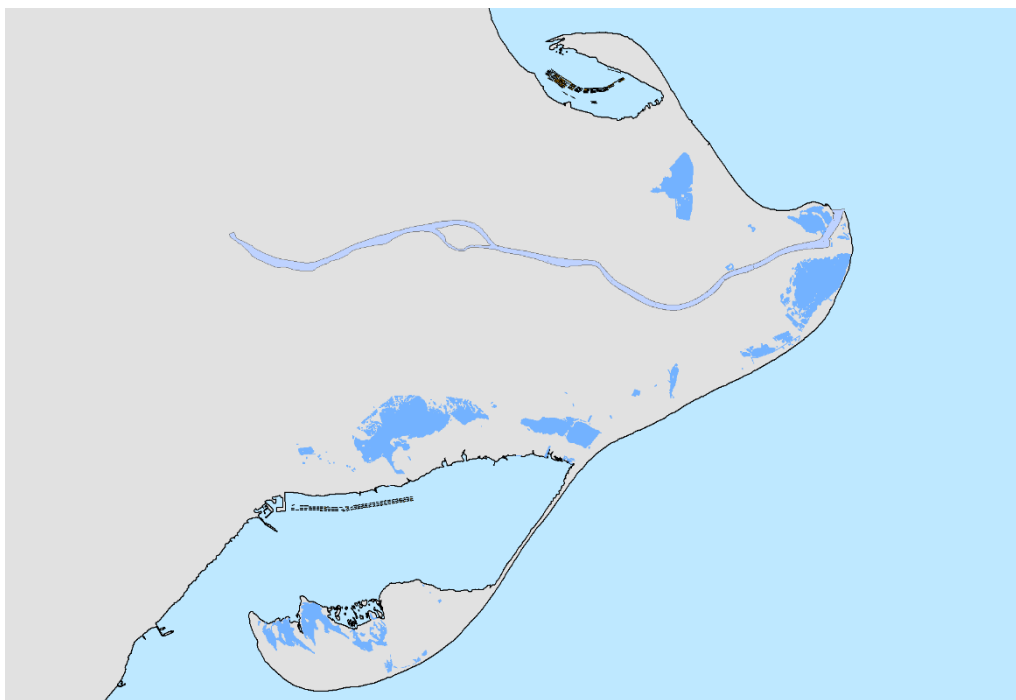


Figura 17: Mapa del Delta de l'Ebre amb les batees de la Badia del Fangar i de la Badia dels Alfacs.

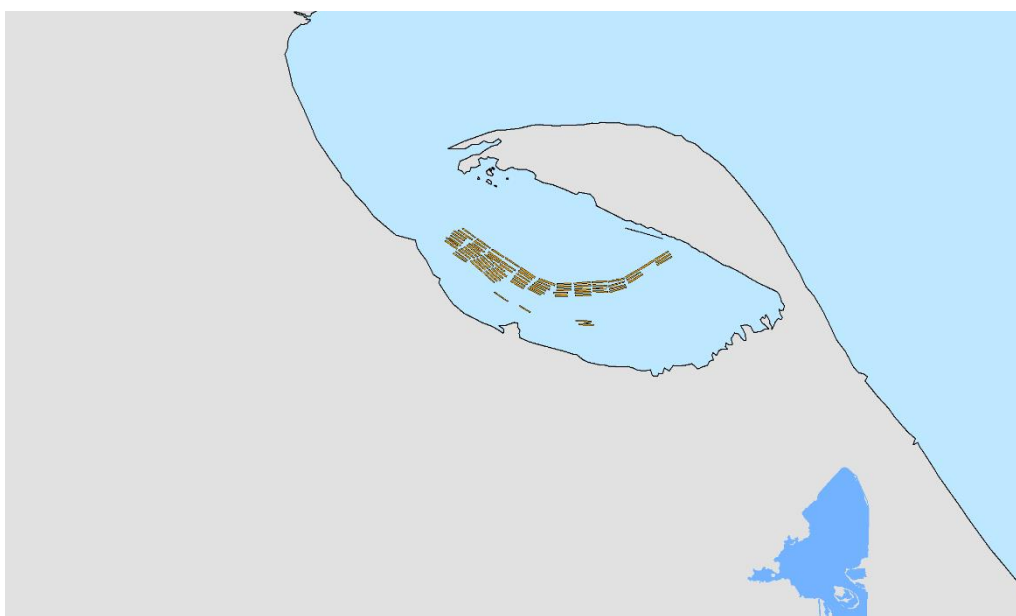


Figura 18: Mapa de la Badia del Fangar amb les seves corresponents batees.

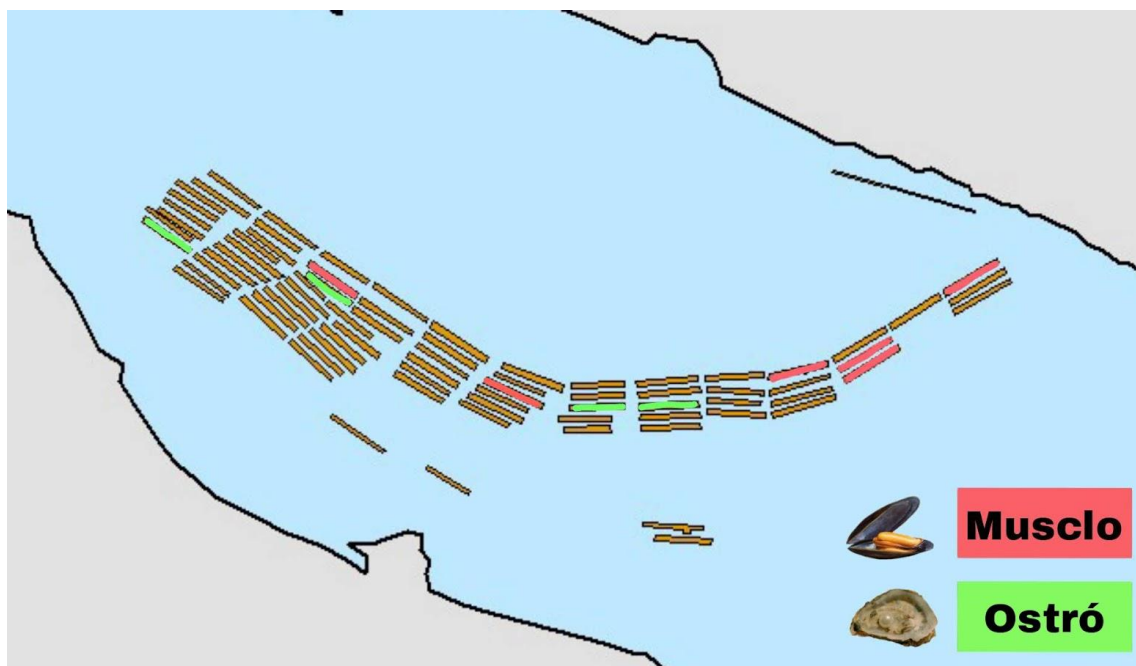


Figura 19: Mapa ampliat de la Badia del Fangar amb la senyalització de les batees de les quals s'han obtingut les mostres de musclo i ostró.

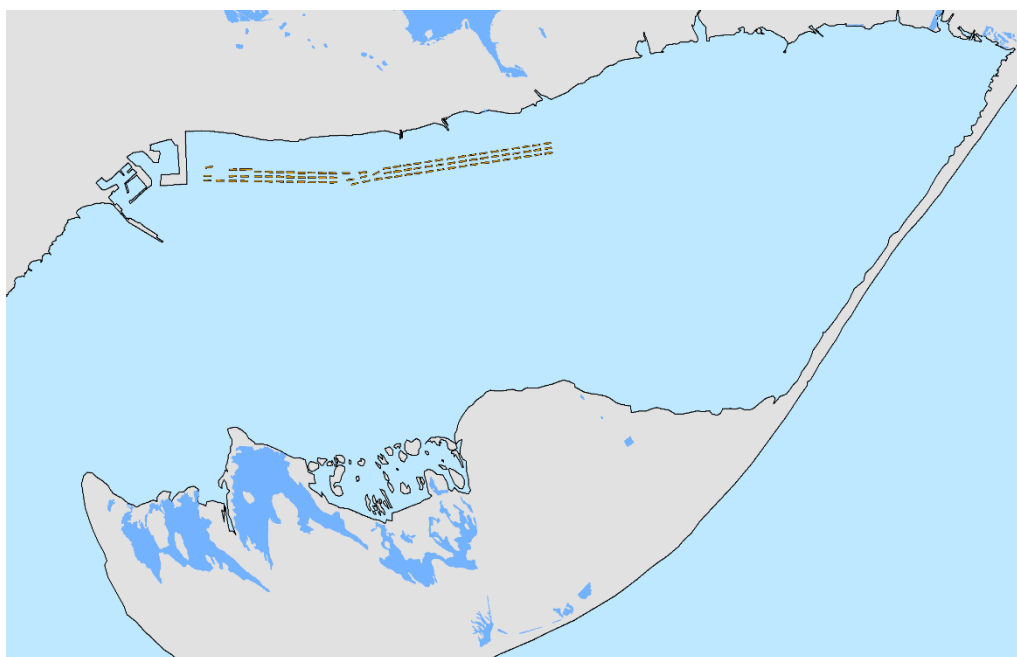


Figura 20: Mapa de la Badia dels Alfacs amb les seves corresponents batees.

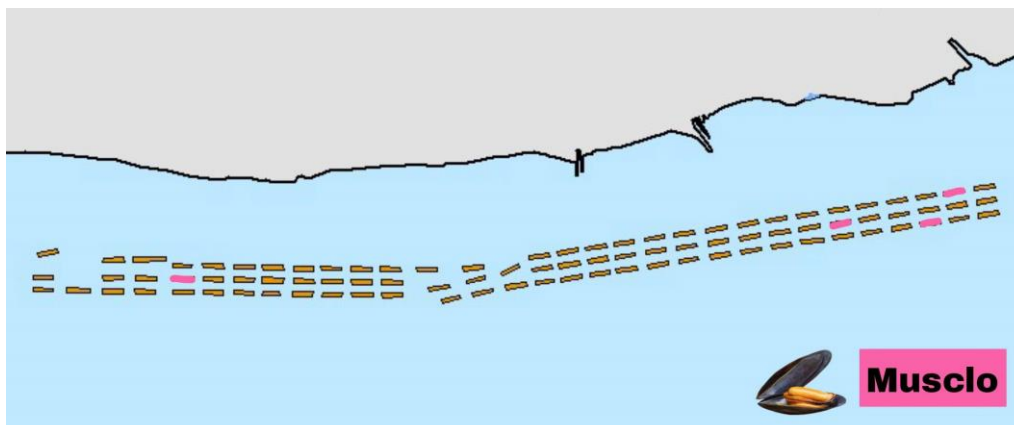


Figura 21: Mapa ampliat de la Badia dels Alfacs amb la senyalització de les batees de les quals s'han obtingut les mostres de musclo.

5.4 Extracció i purificació

Per a l'extracció, els passos que hem dut a terme són els següents:

1. Es retiren les closques dels musclos i ostrons, de manera que només en quedi el teixit.
2. Es tritura el teixit per homogeneïtzar-lo.
3. Es pesen aproximadament 5 g d'homogenat, col·locant-los dins de tubs de centrifugadora de 50 mL.
4. S'afegeixen 5 mL de la solució A dins de cada tub.
5. Es vortexen els tubs durant 5 minuts.
6. S'introdueixen els tubs al bany d'aigua bullint durant 5 minuts.
7. Es treuen els tubs i es col·loquen dintre de vasos de precipitats amb aigua a 20 °C per tal que assoleixin la temperatura ambient.
8. Es tornen a vortexar els tubs durant 5 minuts.
9. Se centrifuguen els tubs a 4500 rpm durant 10 minuts.
10. Es transfereix 1 mL d'extracte a un tub d'1.5 mL.
11. S'afegeixen 5 µL de 25% v/v NH₃ a cada tub i es vortexen durant uns segons.
12. Se centrifuguen els tubs a 10000 rpm durant 1 minut.
13. Un cop centrifugat, es descarta la fase sòlida, i es guarda la líquida en un altre tub.

Per a la purificació, hem fet servir els cartutxos amb filtres de carboni i el mòdul d'extracció de fase sòlida (Fig. 23). El procés s'anomena extracció en fase sòlida ("Solid Phase Extraction" (SPE)). Els passos a seguir són els següents (Fig. 24):

1. Es condiciona el filtre de carboni amb 3 mL de solució B. S'obre clau per a que comencin a baixar gotes lentament (aproximadament, una gota per segon).
2. Un cop s'ha filtrat tota la solució B, s'afegeixen 3 mL de solució C.
3. S'afegeixen 400 μ L d'extracte de marisc a l'interior del cartutx. En aquesta fase, la toxina es quedarà retinguda a l'interior.
4. Es renta el filtre amb 700 μ L d'aigua Milli-Q (s'ha d'anar amb precaució en aquest pas ja que si el flux és massa ràpid, la TTX es podria desprendre). El contingut d'aquest tub s'ha de tirar, és el "waste", i com que no hi ha la toxina al seu interior s'ha de descartar.
5. S'afegeixen 2 mL de solució B (20% v/v ACN amb 1% v/v HAc) per tal d'eluir la TTX. En aquesta fase està la TTX.
6. Es posa el tub del pas 5 al vòrtex durant uns segons, s'agafen 100 μ L d'extracte purificat i s'afegeixen 300 μ L d'ACN.
7. Es filtra l'extracte purificat amb un filtre de 0.22 μ m per eliminar possibles residus que podries causar interferències en els resultats.

Tenint en compte el procés d'extracció i purificació, els extractes obtinguts estan a una concentració de matriu de 50 mg (de matriu) /mL.

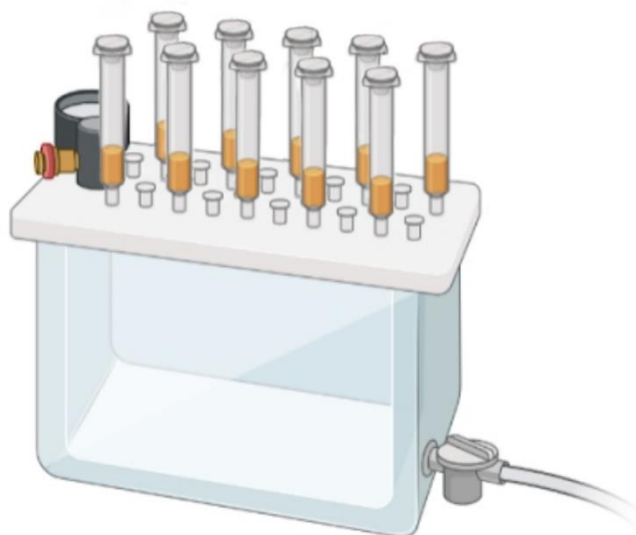


Figura 22: Mòdul d'extracció de fase sòlida per a la purificació de mostres de marisc.

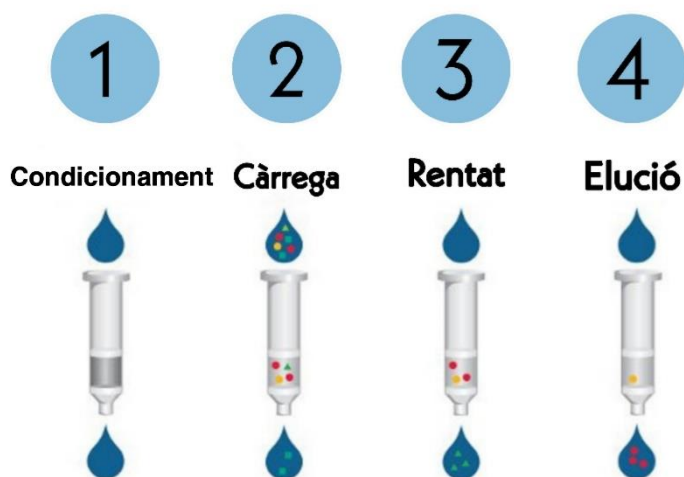


Figura 23: Procés de purificació de mostres de marisc.

5.5 Anàlisi

Per a fer l'anàlisi, hem transferit totes les mostres en vials de 700 μ L de polipropilè, específics per a l'equip de LC-MS/MS. S'ha treballat amb tres conjunt de mostres: mostres corresponents als calibratges, mostres corresponents a l'experiment de dopatge i mostres de les badies.

En primer lloc, s'han construït **corbes de calibratge**, tant en solvent sense matriu de marisc (blanc) com en presència de matriu de musclo i ostró negatius (dels quals se sabia que no contenien TTX). Hem comparat les corbes de calibratge de musclo i ostró amb les de solvent sense matriu per tal d'avaluar si la presència de marisc afecta al calibratge. Les corbes de calibratge en solvent sense matriu de marisc es fan a partir de solvents què han passat per un procés d'extracció i purificació on no hi havia ni musclo ni ostró. Les corbes de calibratge en matriu de marisc es fan a partir d'extractes de musclo i ostró negatius què han passat per un procés d'extracció i purificació. Cal agafar l'estàndard de TTX i fer-ne dilucions en sèrie, en el solvent blanc o en els extractes de musclo i ostró per tal de tenir calibrants de TTX a diferents concentracions. En el nostre cas, hem partit d'una solució de concentració 100 ng/mL, hem preparat una solució de concentració 5 ng/mL (20 vegades diluïda, que correspon a L6) i l'hem diluït a la meitat successivament en el solvent blanc i també en els extractes de musclo i ostró negatius. A continuació es detalla el càlcul per passar la primera concentració en solució a concentració en matriu, com a exemple:

$$\begin{aligned} \frac{5 \text{ ng TTX}}{1 \text{ mL solució}} \cdot \frac{1 \text{ mL solució}}{50 \text{ mg musclo}} &= \frac{5 \text{ ng TTX}}{50 \text{ mg musclo}} = \frac{0.1 \text{ ng TTX}}{1 \text{ mg musclo}} = \\ &= \frac{0.1 \text{ } \mu\text{g TTX}}{1 \text{ g musclo}} = 100 \text{ } \mu\text{g/kg} \end{aligned}$$

Per tant, les concentracions que hem preparat són les següents:

Taula 3: Concentracions en solució i en matriu dels calibrants.

Calibrant	Concentració (en solució)	Concentració (en matriu)
L6	5 ng/mL	100 μ g/kg
L5	2.5 ng/mL	50 μ g/kg
L4	1.25 ng/mL	25 μ g/kg
L3	0.625 ng/mL	12.5 μ g/kg
L2	0.310 ng/mL	6.3 μ g/kg

L1	0.156 ng/mL	3.2 µg/kg
L0	0.078 ng/mL	1.6 µg/kg

En segon lloc, s'han preparat els **dopatges** dels homogenats de músculo i ostró negatius amb una concentració de TTX equivalent a 44 µg/kg perquè és el nivell que l'EFSA recomana com a guia, ja que amb aquesta concentració de toxina no s'han observat efectes tòxics adversos. Després del dopatge dels homogenats, s'ha dut a terme l'extracció i purificació. Amb aquest experiment, hem pogut saber la quantitat de TTX que queda després d'aquests passos d'extracció i purificació (ja que durant aquests processos sempre es produeixen uns pèrdues de TTX que s'han de corregir en les quantificacions), és a dir, el percentatge de recuperació.

En tercer lloc, s'han analitzat **mostres naturals** de marisc de les badies de les quals no se sap la concentració de TTX per tal de fer una avaluació d'aquest risc potencial a les badies del Delta.

Per tal de dur a terme l'anàlisi amb LC/MS-MS, s'ha procedit de la següent manera per als tres tipus de mostres:

1. Les solucions, ja en vials, es col·loquen a l'interior de la màquina.
2. S'engega la màquina, i primer es passa un flux de 0.1 mL/min, amb 50% de fase mòbil A1 i l'altre 50% de fase mòbil B1.
3. Quan la pressió s'estabilitza, el flux s'ha d'augmentar poc a poc, de dècima en dècima, esperant cada vegada que augmenta a que s'estabilitzi, fins arribar a 0.4 mL/min. És necessari l'augment del flux gradualment ja que un augment sobtat de la pressió podria ocasionar greus accidents.
4. Es fa una neteja de la màquina ("clean-up") amb fases mòbils per eliminar les impureses d'anàlisis anteriors que puguin interferir en els resultats d'aquest.
5. S'injecten les mostres. Entre tipus de mostres, cal injectar solvent per a netejar el sistema.

6. Un cop s'acaba el processat de totes les mostres, s'ha de netejar la columna ("clean-up") i apagar l'equip ("shutdown").

6. Resultats i discussió

En un anàlisi per LC/MS-MS es produeix una “doble separació”: una per l'afinitat dels analits amb la fase estacionària de la columna i l'altra basada en la relació massa/càrrega (m/z). Això fa que sigui una tècnica amb una alta selectivitat.

En primer lloc, s'han obtingut les **corbes de calibratge**, tant en solvent blanc com en presència de matriu de múscul i ostró (totes en les unitats de ng/mL). Quan s'injecta la TTX en solvent blanc, els cromatogrames mostren un pic a un temps de retenció al minut 5.02. L'observació d'aquest pic és indicatiu de la presència de TTX. Aquest pic s'ha d'observar a qualsevol de les dues transicions de la TTX, que són $320.1 > 302.1$ i $320.1 > 162.1$. L'estàndard de TTX conté una mica d'4-*epi*-TTX. Aquest anàleg, tot i que té les mateixes transicions, es pot diferenciar de la TTX perquè surt abans (menor temps de retenció). No obstant, en els nostres experiments no s'observa el pic de l'anàleg perquè proporcionalment n'hi ha molt menys que de TTX (menor concentració).

Quan s'injecta la TTX en extracte de múscul i d'ostró, també s'observa el pic de la TTX. No obstant, la presència d'extracte de marisc fa que el temps de retenció es desplaci lleugerament, apareixent al min 4.93 en el cas del múscul i al min 4.85/4.86 en el cas de l'ostró. A continuació, el software identifica el pic (Figures 25-27) i en calcula l'àrea. A partir de les concentracions de TTX utilitzades i amb les àrees obtingudes (Taula 3), el mateix software construeix les corbes de calibratge (Figures 28-30).

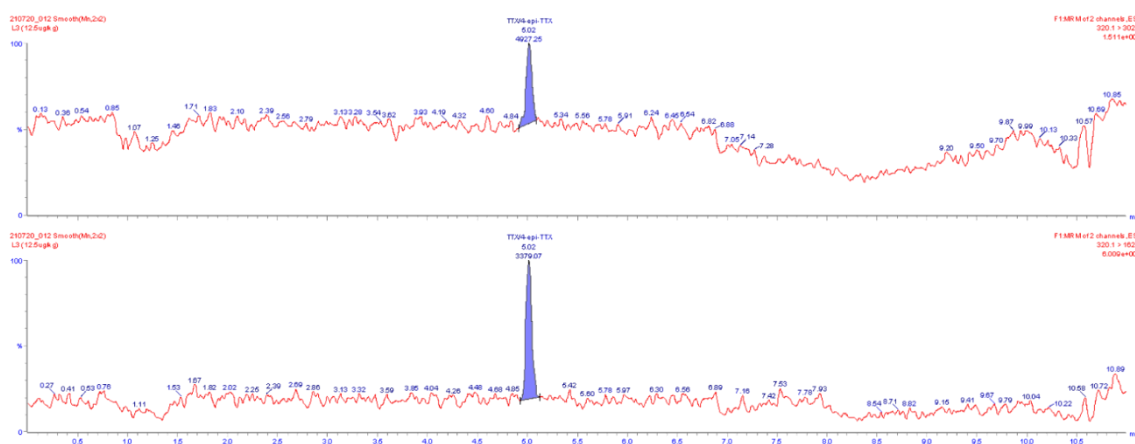


Figura 24: Cromatogrames de la tetrodotoxina (TTX) en solvent blanc. Dalt: cromatograma de la transició $320.1 > 302.1$. Baix: cromatograma de la transició $320.1 > 162.1$.

Avaluació de la presència de tetrodotoxina en mostres de marisc del Delta de l'Ebre

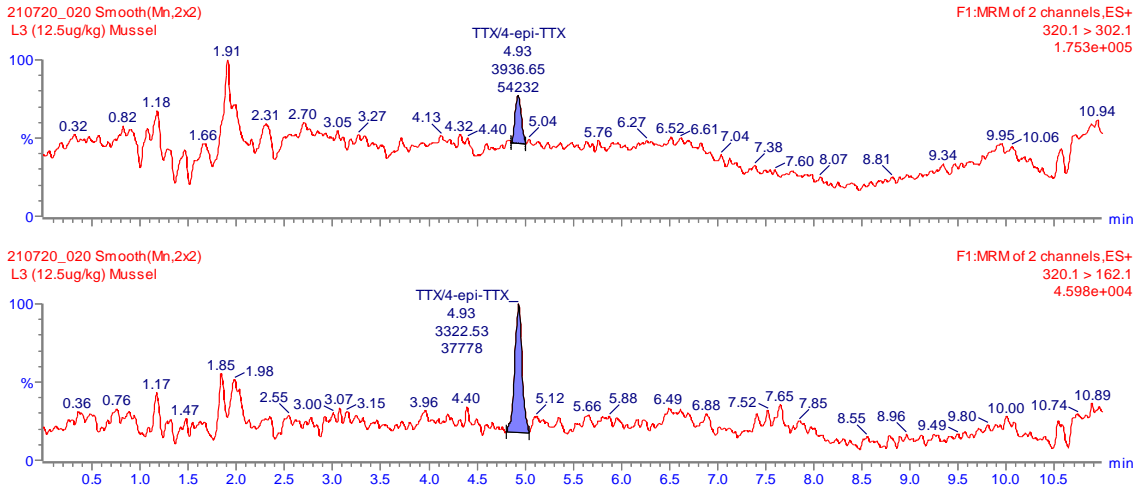


Figura 25: Cromatogrames de la tetrodotoxina (TTX) a 12.5 µg/kg en extracte de musclo. Dalt: cromatograma de la transició 320.1 > 302.1. Baix: cromatograma de la transició 320.1 > 162.1.

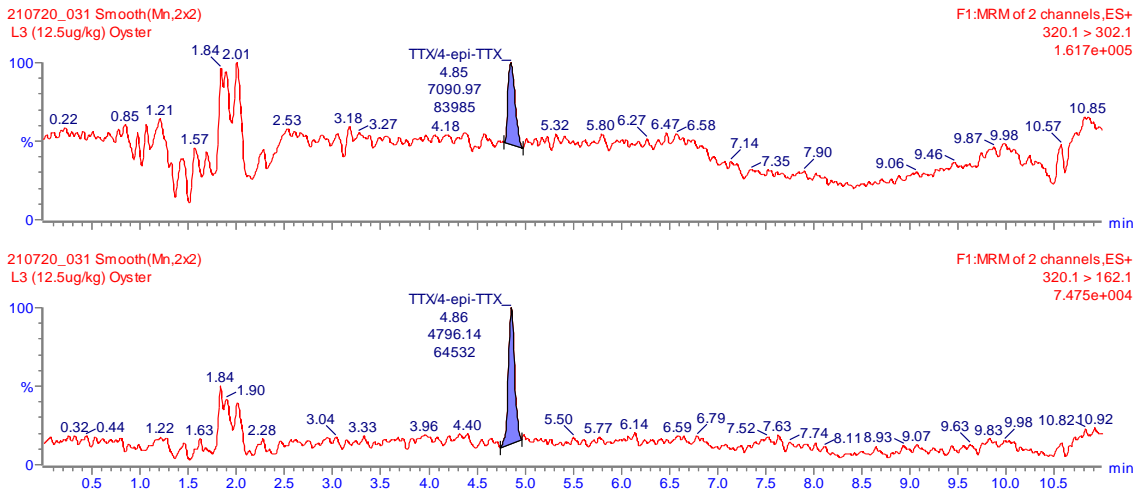


Figura 26: Cromatogrames de la tetrodotoxina (TTX) a 12.5 µg/kg en extracte d'ostró. Dalt: cromatograma de la transició 320.1 > 302.1. Baix: cromatograma de la transició 320.1 > 162.1.

Taula 4: Temps de retenció i àrees obtinguts en la construcció de les corbes de calibratge en solvent blanc i en presència de matrius de musclo i ostró.

	Concentració (ng/mL)	Temps de retenció (min)	Àrea
Solvent blanc	0.078	5.171	1253
	0.156	5.091	1858
	0.310	5.075	2681
	0.625	5.015	4927

	1.250	4.935	8515
	2.500	4.762	19373
	5.000	4.978	36906
Matriu de musclo	0.078	4.956	239
	0.156	4.978	761
	0.310	4.929	1427
	0.625	4.929	3937
	1.250	4.832	9884
	2.500	4.827	17573
	5.000	4.897	36100
Matriu d'ostró	0.078	4.929	3.575
	0.156	4.886	4.069
	0.310	4.891	5.223
	0.625	4.854	7.091
	1.250	4.843	11.241
	2.500	4.816	17.687
	5.000	4.805	34.567

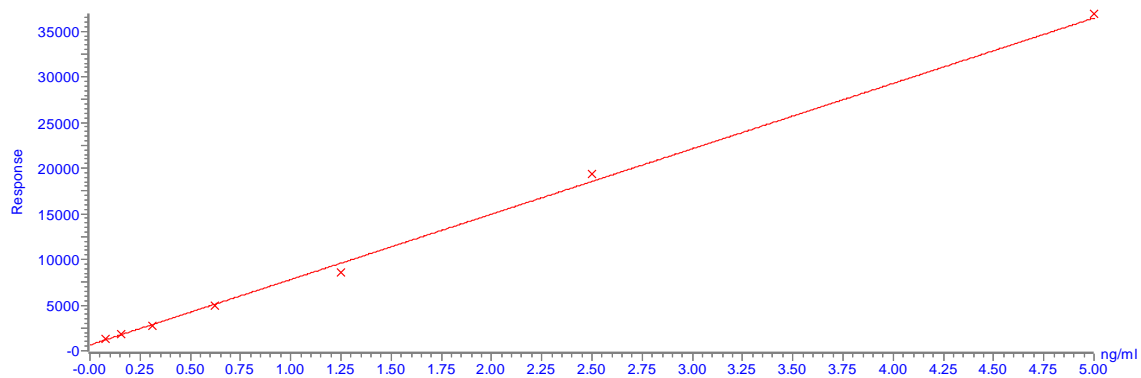


Figura 27: Corba de calibratge de la tetrodotoxina (TTX) en solvent blanc.

Avaluació de la presència de tetrodotoxina en mostres de marisc del Delta de l'Ebre

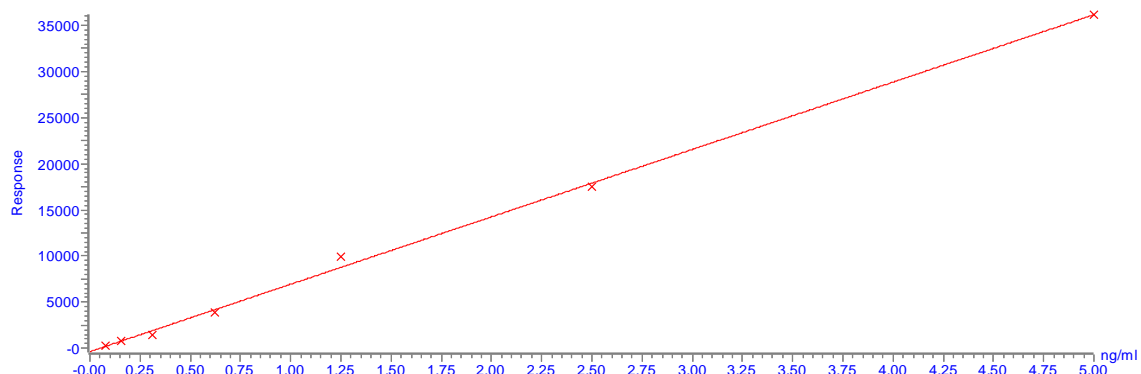


Figura 28: Corba de calibratge de la tetrodotoxina (TTX) en extracte de músculo.

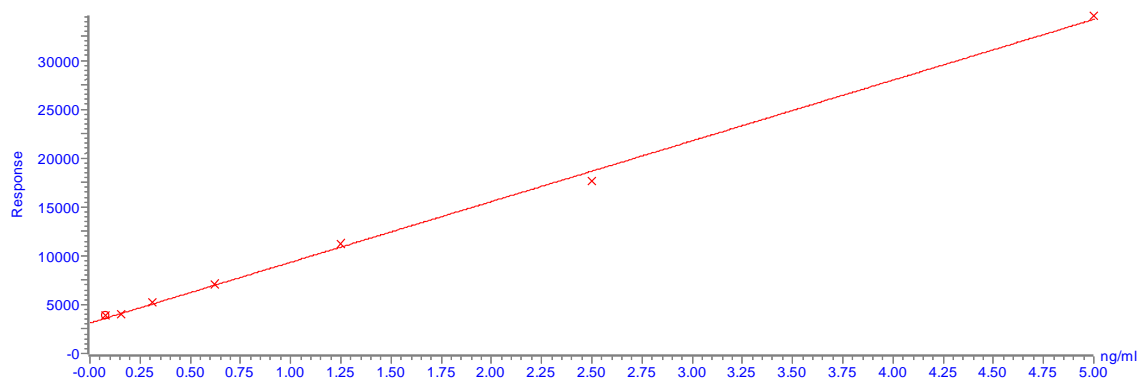


Figura 29: Corba de calibratge de la tetrodotoxina (TTX) en extracte d'ostró.

A més a més, el software proporciona les equacions de les corbes de calibratge, que en aquest cas corresponen a un ajust lineal ($y = ax + b$) (Taula 4).

Taula 5: Equacions i coeficients de determinació de les corbes de calibratge de TTX en solvent blanc, extracte de músculo i extracte d'ostró.

	Equació de la corba de calibratge	r^2
Solvent blanc	$y = 7160.41x + 641.318$	0.9963
Extracte de músculo	$y = 7302.40x - 359.033$	0.9984
Extracte d'ostró	$y = 6214.32x + 3120.480$	0.9981

Com es pot observar a la Taula 3, en el cas del calibratge en matriu de músculo, a concentracions baixes de TTX, els valors de les àrees són inferiors que en el cas del calibratge en solvent blanc. Per altra banda, en el cas del calibratge en matriu d'ostró, l'efecte és el contrari (els valors de les àrees són superiors que en el cas del calibratge en solvent blanc). No obstant, això no suposa cap problema, perquè en els tres casos s'han obtingut corbes de calibratge excel·lents. Això es pot observar amb els valors dels coeficients de determinació (r^2) de la Taula 4. El coeficient de determinació indica el grau de variació entre dues variables mesurant la distància entre cada punt i la recta dels valors mitjans; oscil·la entre el 0 i l'1, com més alt és significa que el mètode utilitzat té més precisió. Com es pot comprovar observant els valors de r^2 , l'ajust lineal és excel·lent en els tres casos. Així doncs, aquestes corbes de calibratge en extracte de músculo i ostró són les que es faran servir per a quantificar la TTX present en els dopatges i en les mostres naturals.

El límit de detecció (LOD) d'una tècnica és la quantitat mínima de toxina que es pot detectar. El LOD es calcula a partir del blanc més 3 vegades la seva desviació estàndard. El límit de quantificació (LOQ) és la quantitat mínima de toxina que es pot quantificar i és superior al LOD. El LOQ es calcula a partir del blanc més 10 vegades la seva desviació estàndard. No obstant, en aquest treball s'ha calculat un LOQ experimental, corresponent a la concentració més petita de la corba de calibratge que ha pogut ser quantificada. En els nostres experiments s'ha obtingut un LOQ d'1.6 µg/kg per a músculo i de 3.2 µg/kg per a ostró.

En segon lloc, s'ha avaluat la recuperació de TTX durant els processos d'extracció i purificació dels **homogenats de músculo i ostró dopats** amb una concentració de TTX equivalent a 44 µg/kg. Quan es fa l'extracció i purificació d'una mostra, es pot perdre una part de la toxina en el procés. La relació entre la quantitat de TTX que s'obté en l'anàlisi i la que s'ha dopat s'anomena recuperació i s'expressa en percentatge. Una major recuperació significa més eficiència en els mètodes utilitzats. Aplicant aquest percentatge al valor obtingut en l'anàlisi d'una mostra, podem calcular la quantitat inicial de TTX en les mostres.

A continuació es mostren els cromatogrames obtinguts en els experiments de dopatge:

Avaluació de la presència de tetrodotoxina en mostres de marisc del Delta de l'Ebre

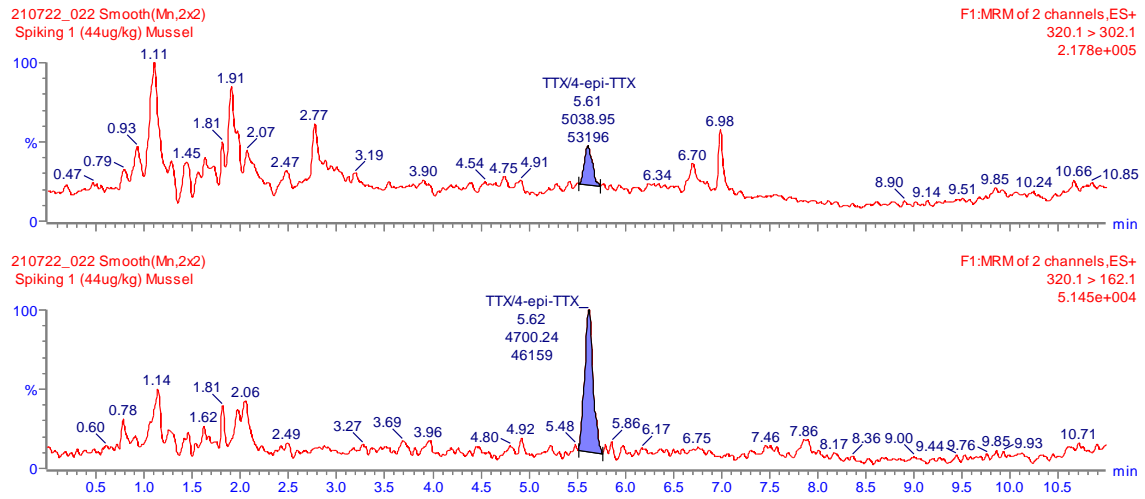


Figura 30: Cromatograma de la tetrodotoxina (TTX) en extracte de músculo dopat a 44 µg/kg.

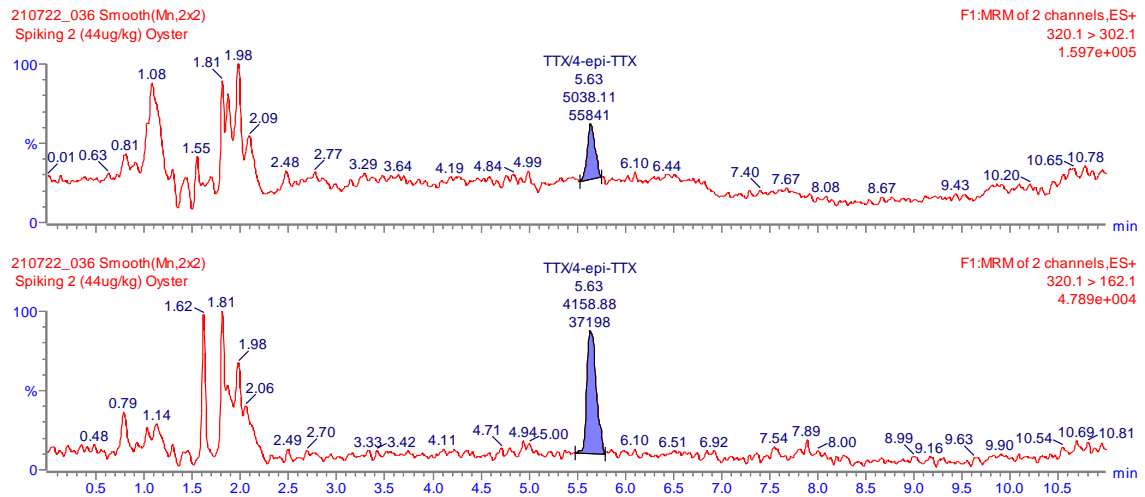


Figura 31: Cromatograma de la tetrodotoxina (TTX) en extracte d'ostró dopat a 44 µg/kg.

En aquests experiments, els temps de retenció han augmentat lleugerament (min 5.61/5.62 per al músculo i min 5.63 per a l'ostró). Els dopatges s'han dut a terme en duplicat. Quan hem quantificat la TTX obtinguda en els dopatges de l'extracte de músculo a 44 µg/kg, s'han obtingut valors de 18 i 24 µg/kg. Per tant, la recuperació mitjana és del 47.7%.

$$\frac{18 \mu\text{g}/\text{kg}}{44 \mu\text{g}/\text{kg}} \cdot 100 = 40.9\%$$

$$\frac{24 \mu\text{g}/\text{kg}}{44 \mu\text{g}/\text{kg}} \cdot 100 = 54.5\%$$

En el cas dels dopatges de l'extracte d'ostró, també a 44 µg/kg, s'han obtingut valors de 12 i 14 µg/kg. Per tant, la recuperació mitjana és del 29.5%.

$$\frac{12 \mu\text{g}/\text{kg}}{44 \mu\text{g}/\text{kg}} \cdot 100 = 27.4\%$$

$$\frac{14 \mu\text{g}/\text{kg}}{44 \mu\text{g}/\text{kg}} \cdot 100 = 31.8\%$$

Com es pot observar, la recuperació de la TTX és millor en mostres de músculo que en mostres d'ostró. Idealment, s'esperava obtenir recuperacions d'aproximadament el 80%. Per tant, l'IRTA optimitzarà els mètodes d'extracció, purificació i detecció per tal d'augmentar els percentatges de recuperació obtinguts. No obstant, els valors obtinguts es poden fer servir per al càlcul de les concentracions de TTX

Finalment, s'ha procedit a analitzar les **mostres naturals** de marisc de les badies. A la Fig. 33 es pot veure el cromatograma de la mostra AM88-270720 (músculo de la Badia dels Alfacs) com a exemple. Com es pot observar, no s'aprecia el pic de la TTX al seu temps de retenció característic. El mateix va passar amb totes les mostres, tant de músculo com d'ostró, tant de la Badia dels Alfacs com de la Badia del Fangar.

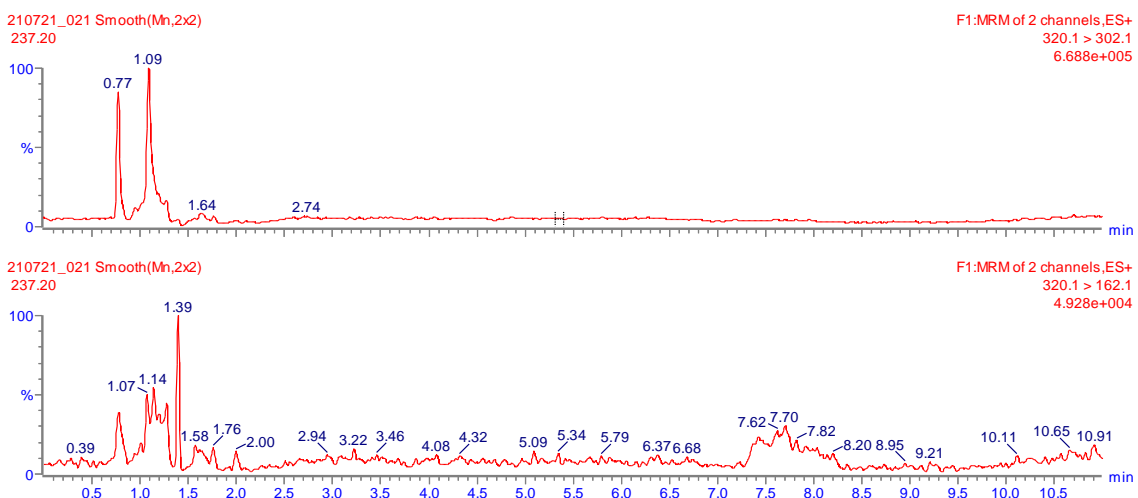


Figura 32: Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la mostra AM88-270720.

Per aquests resultats, es pot deduir que cap d'aquestes mostres conté TTX per sobre del nostre LOD. Per tant, la presència de TTX en marisc del Delta de l'Ebre no sembla ser un risc.

En el cas de que haguéssim detectar pics de TTX per sobre del LOQ, s'hauria pogut quantificar la seva concentració en les mostres gràcies a les corbes de calibratges fetes anteriorment amb els estàndards i als percentatges de recuperació. En cas que algunes concentracions haguessin superat els 44 µg/kg s'hauria alertat de la presència de toxina, però com que no s'ha donat el cas, no ha estat necessari.

No obstant, s'hauria de fer un cribratge cada cert temps perquè aquesta situació idònia d'absència de TTX en marisc podria canviar.

7. Conclusions

En aquest treball s'han dut a terme diferents tasques per tal d'avaluar la possible presència de TTX en mostres de marisc de les badies del Delta de l'Ebre.

S'ha establert un protocol per a l'extracció i purificació de la TTX de mostres de marisc (musclo i ostró). Aquest protocol està basat en una extracció en fase sòlida mitjançant cartutxos amb filtres de carboni.

S'ha establert un protocol per a la detecció de TTX en solvent mitjançant LC-MS/MS. S'ha vist que la TTX mostra un pic en el cromatograma al minut 5.02 (temps de retenció). La presència d'extracte de musclo i ostró fa que el temps de retenció de la TTX variï lleugerament (min 4.93/5.62 en musclo i min 4.85/5.63 en ostró).

A més, s'han obtingut les corbes de calibratge de TTX en solvent blanc i extractes de musclo i ostró, que són lleugerament diferents però amb coeficients de determinació excel·lents i, per tant, útils per a fer-les servir en les quantificacions. S'ha obtingut un LOQ d'1.6 µg/kg per a musclo i de 3.2 µg/kg per a ostró.

S'ha avaluat el percentatge de recuperació de TTX durant la seva extracció i purificació a partir d'homogenats de musclo i ostró dopats al nivell suggerit per l'EFSA (44 µg/kg). Aquest percentatge ha estat del 47.7% per a musclo i 29.5% per a ostró.

S'ha analitzat la possible presència de TTX en mostres naturals de marisc de les badies del Delta de l'Ebre i s'ha vist que ni les mostres de musclo ni les d'ostró contenen TTX. Per tant, actualment, la seguretat alimentària està garantida i la salut del consumidor està protegida.

Com a treball futur, s'hauria de millorar el protocol d'extracció i purificació, ja que els percentatges de recuperació obtinguts han estat bastant baixos (idealment haurien de ser, com a mínim, del 80%). Caldria millorar els passos de condicionament, càrrega, rentat i elució, perquè és possible que la TTX o bé no quedi retinguda durant la càrrega i el rentat, o bé no s'elueixi. També proposaria

fer un cribratge de la possible presència de TTX en marisc de les badies del Delta de l'Ebre de manera periòdica.

Personalment, estic molt satisfeta d'aquesta petita investigació que he dut a terme ja que he adquirit molts coneixements químics, a més a més d'experiència i agilitat al laboratori.

8. Referències

Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., & Furey, A. (2014). Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*, 6(2), 693–755. <https://doi.org/10.3390/toxins6020693>

Biessy, L., Boundy, M. J., Smith, K. F., Harwood, D. T., Hawes, I., & Wood, S. A. (2019). Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: A mini-review. *Chemosphere*, 236, 124404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124404>

Caamaño, A., & Obach, D. (2018). *Reacció*. Teide.

Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Polito, G., Dean, K., Giacobbe, M., Casabianca, S., Capellacci, S., Penna, A., & Turner, A. D. (2019). First detection of tetrodotoxin and high levels of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Sicily (Italy) by three different analytical methods. *Chemosphere*, 215, 881–892. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.081>

EFSA (European Food Safety Authority), 2017. Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal*, 15, 4752. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4752>

EURLMB (European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins), 2017. *Determination of tetrodotoxin by HILIC-MS/MS*. https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/HILIC-LCMSMS_SOP_for_TTX_in_mussels.pdf (última data de consulta: 2/1/22)

Fundación iO, 2020. *Pez globo – Tetrodotoxina*. <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/pez-globo-tetrodotoxina/> (última data de consulta: 2/1/22)

Generalitat de Catalunya. (18 de setembre de 2019). *Biotoxines marines*. Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA). <https://acsa.gencat.cat/ca/detall/article/Biotoxines-marines-00001> (última data de consulta: 2/1/22)

Gerssen, A., Pol-Hofstad, I. E., Poelman, M., Mulder, P. P., van den Top, H. J., & de Boer, J. (2010). Marine Toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins*, 2(4), 878–904. <https://doi.org/10.3390/toxins2040878>

Gerssen, A., Bovee, T., Klijnstra, M., Poelman, M., Portier, L., & Hoogenboom, R. (2018). First report on the occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks in the Netherlands. *Toxins*, 10(11), 450. <https://doi.org/10.3390/toxins10110450>

Hort, V., Arnich, N., Guérin, T., Lavison-Bompard, G., & Nicolas, M. (2020). First detection of tetrodotoxin in bivalves and gastropods from the French mainland coasts. *Toxins*, 12(9), 599. <https://doi.org/10.3390/toxins12090599>

IRTA. *Tetrodotoxin Detection Assay* [Vídeo]. Vimeo. <https://vimeo.com/537220370> (última data de consulta: 2/1/22)

Leão, J., Lozano-Leon, A., Giráldez, J., Vilariño, S., & Gago-Martínez, A. (2018). Preliminary results on the evaluation of the occurrence of tetrodotoxin associated to marine *Vibrio* spp. in bivalves from the Galician rias (Northwest of Spain). *Marine Drugs*, 16(3), 81. <https://doi.org/10.3390/md16030081>

Rodríguez, I., Alfonso, A., González-Jartín, J. M., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins. *Talanta*, 189, 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.050>

Tetrodotoxin. (s. f.). PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrodotoxin> (última data de consulta: 2/1/22)

Turner, A. D., Powell, A., Schofield, A., Lees, D. N., & Baker-Austin, C. (2015). Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Eurosurveillance*, 20(2), 21009. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.2.21009>

Turner, A. D., Boundy, M. J., & Rapkova, M. D. (2017). Development and single-laboratory validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry

method for quantitation of tetrodotoxin in mussels and oysters. *Journal of AOAC International*, 100(5), 1469–1482. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0017>

Vlamiş, A., Katikou, P., Rodríguez, I., Rey, V., Alfonso, A., Papazachariou, A., Zacharaki, T., Botana, A., & Botana, L. (2015). First detection of tetrodotoxin in Greek shellfish by UPLC-MS/MS potentially linked to the presence of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins*, 7(5), 1779–1807. <https://doi.org/10.3390/toxins7051779>

Índex d'abreviatures

ACN	Acetonitril (Acetonitrile)
ASP	Intoxicació amnèsica provocada pel consum de marisc (Amnesic Shellfish Poisoning)
AZP	Intoxicació provocada pel consum de marisc contaminat amb azaspiràcids (Azaspiracid Shellfish Poisoning)
AZP-1	Azaspiràcid-1 (Azaspiracid-1)
DA	Àcid domoic (Domoic Acid)
DSP	Intoxicació diarreica provocada pel consum de marisc (Diarrheic Shellfish Poisoning)
EFSA	Agència Europea de Seguretat Alimentària (European Food Safety Authority)
ELISA	Assaig immunosorbent enllaçat amb enzim (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EURLMB	Laboratori de Biotoxines Marines de Referència a la Unió Europea (European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins)
FA	Àcid fòrmic (Formic Acid)
GC-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry)
HAc	Àcid acètic (Acetic acid)

HPLC	Cromatografia líquida d'alt rendiment (High Performance Liquid Chromatography)
LC-FLD	Cromatografia líquida acoblada a detecció fluorimètrica (Liquid Chromatography coupled to FLuorescence Detection)
LC-MS	Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry)
LOD	Límit de detecció (Limit Of Detection)
LOQ	Límit de quantificació (Limit Of Quantification)
LSP	Intoxicació provocada pel consum de marisc amb toxines lipofíliques (Lipophilic Shellfish Poisoning)
MBA	Bioassaig ratolí (Mouse Bioassay)
MeOH	Metanol (Methanol)
OA	Àcid okadaic (Okadaic Acid)
PSP	Intoxicació paralitzant provocada pel consum de marisc (Paralytic Shellfish Poisoning)
PTX-2	Pectenotoxina-2 (Pectenotoxin-2)
RBA	Bioassaig rata (Rat Bioassay)

SPE	Extracció en fase sòlida (Solid Phase Extraction)
STX	Saxitoxina (Saxitoxin)
TTX	Tetrodotoxina (Tetrodotoxin)

Índex de figures

Figura 1: Xarxes tròfiques per les quals es poden transmetre les toxines marines (Gerssen et al., 2010).....	4
Figura 2: Estructura de l'àcid domoic (DA).....	5
Figura 3: Estructura de la saxitoxina (STX).....	5
Figura 4: Estructura de l'àcid okadaic (OA).....	6
Figura 5: Estructura de l'azaspiracid-1 (AZA-1).....	7
Figura 6: Estructura de la pectenotoxina-2 (PTX-2).....	7
Figura 7: Estructura de la yessotoxina (YTX).....	7
Figura 8: Estructura de la gimnodimina A (GYM-A).....	8
Figura 9: Estructura del 13-desmetil espiròlid C (13-desMe-SPX-C).....	8
Figura 10: Estructura de la pinnatoxina (PnTX G).....	8
Figura 11: Estructura de la brevetoxina (PbTx-2).....	9
Figura 12: Formació de la tetrodotoxina (TTX) a partir d'una molècula de D-glucosa (Bane et al., 2014).....	10
Figura 13: Estructura de la tetrodotoxina (TTX).....	10
Figura 14: Representació 3D de la tetrodotoxina (TTX) (PubChem).....	11
Figura 15: Diferents anàlegs de la tetrodotoxina (TTX) segons els seus radicals (Bane et al., 2014).....	13
Figura 16: Detecció de TTX en bivalves i gastròpodes comestibles en les quatre últimes dècades. Els números entre parèntesis signifiquen el nombre d'espècies diferents en les que s'ha detectat la toxina (Biessy et al., 2019).....	15
Figura 17: Mapa del Delta de l'Ebre amb les batees de la Badia del Fangar i de la Badia dels Alfacs.....	22

Figura 18: Mapa de la Badia del Fangar amb les seves corresponents batees.	22
Figura 19: Mapa ampliat de la Badia del Fangar amb la senyalització de les batees de les quals s'han obtingut les mostres de músculo i ostró.	23
Figura 20: Mapa de la Badia dels Alfacs amb les seves corresponents batees.	23
Figura 21: Mapa ampliat de la Badia dels Alfacs amb la senyalització de les batees de les quals s'han obtingut les mostres de músculo.	24
Figura 22: Mòdul d'extracció de fase sòlida per a la purificació de mostres de marisc.	26
Figura 23: Procés de purificació de mostres de marisc.	26
Figura 24: Cromatogrames de la tetrodotoxina (TTX) en solvent blanc. Dalt: cromatograma de la transició 320.1 > 302.1. Baix: cromatograma de la transició 320.1 > 162.1.	30
Figura 25: Cromatogrames de la tetrodotoxina (TTX) a 12.5 µg/kg en extracte de músculo. Dalt: cromatograma de la transició 320.1 > 302.1. Baix: cromatograma de la transició 320.1 > 162.1.	31
Figura 26: Cromatogrames de la tetrodotoxina (TTX) a 12.5 µg/kg en extracte d'ostró. Dalt: cromatograma de la transició 320.1 > 302.1. Baix: cromatograma de la transició 320.1 > 162.1.	31
Figura 27: Corba de calibratge de la tetrodotoxina (TTX) en solvent blanc.	32
Figura 28: Corba de calibratge de la tetrodotoxina (TTX) en extracte de músculo.	33
Figura 29: Corba de calibratge de la tetrodotoxina (TTX) en extracte d'ostró. .	33

Figura 30: Cromatograma de la tetrodotoxina (TTX) en extracte de músculo dopat a 44 µg/kg.....	35
Figura 31: Cromatograma de la tetrodotoxina (TTX) en extracte d'ostró dopat a 44 µg/kg.	35
Figura 32: Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la mostra AM88-270720.	36

Índex de taules

Taula 1: Dades de les mostres utilitzades com a blancs i per a dopar.....	20
Taula 2: Dades de les mostres analitzades.....	21
Taula 3: Concentracions en solució i en matriu dels calibrants.	27
Taula 4: Temps de retenció i àrees obtinguts en la construcció de les corbes de calibratge en solvent blanc i en presència de matrius de músclo i ostró.	31
Taula 5: Equacions i coeficients de determinació de les corbes de calibratge de TTX en solvent blanc, extracte de músclo i extracte d'ostró.....	33