



Ekitaldi-aretoa,
Eusko Jaurlaritza,
2022ko apirilaren 7a

**ELIKAGAIEN
SEGURTASUNAREN
ARLOKO IKERKETA
EMAITZAK
TRANSFERITZEKO**

**IX. JARDUNALDIA
JORNADA DE
TRANSFERENCIA DE
RESULTADOS DE
INVESTIGACIÓN**

Salón de Actos,
Gobierno Vasco, Lakua
7 abril 2022



Nuevos métodos rápidos para el control de la seguridad alimentaria

Elikagaien segurtasuna kontrolerako metodologia azkar berriak

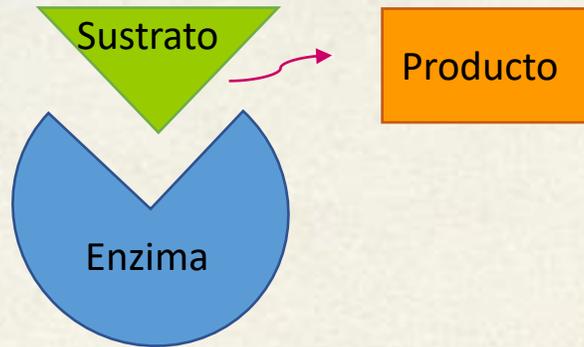
Alejandro Barranco Ibarbia

abarranco@azti.es

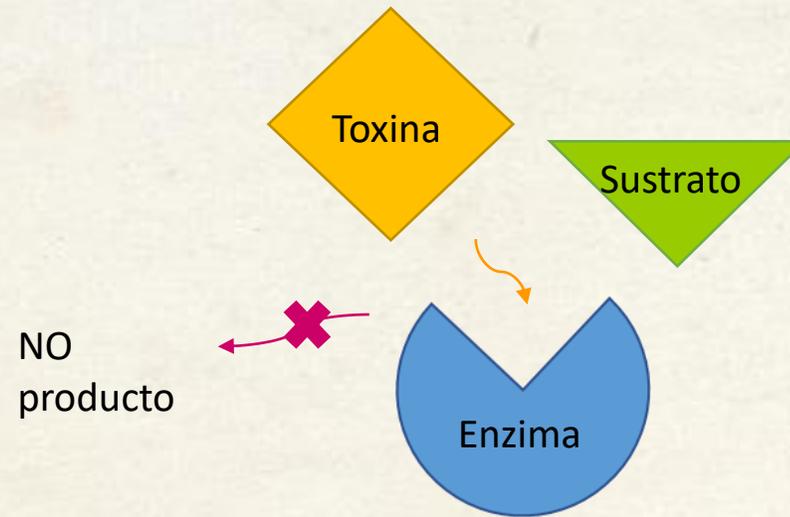


FUNDAMENTO

Actividad enzimática

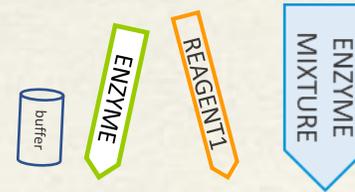


Inhibición de la actividad enzimática

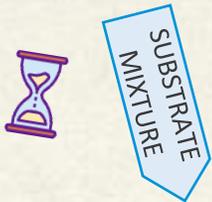


FUNDAMENTO

1 Preparar disolución de enzima.



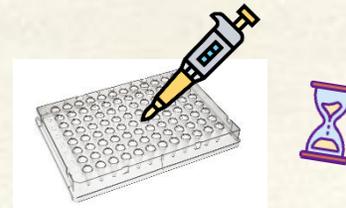
2 Añadir disolución de enzima y muestra.



3 Incubar 10 minutos a 37°C y preparamos disolución de sustrato.



4 Añadir sustrato e incubar <60 minutos a 37°C y medir la señal obtenida



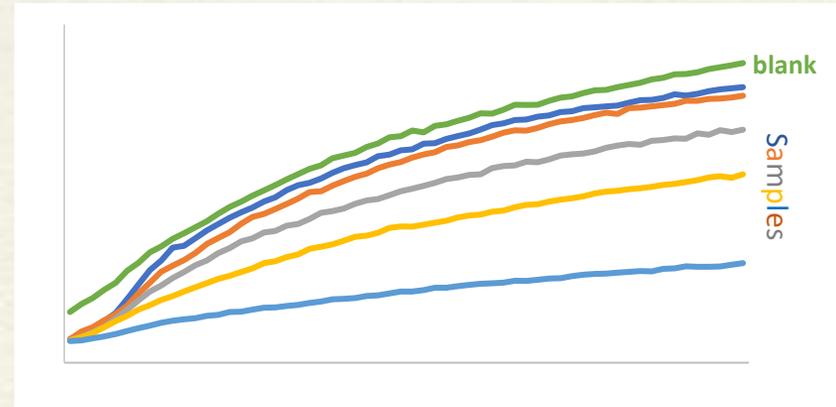
FUNDAMENTO



La señal observada es proporcional a la cantidad de producto que se genera durante la reacción enzimática.

Comparando las señales con la de un blanco (buffer), se puede calcular un porcentaje de inhibición

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{S_{\text{sample}}}{S_{\text{blank}}} \right) \times 100$$



Se calcula un **Valor de corte** para cada sustancia activa que se correlaciona con una concentración.

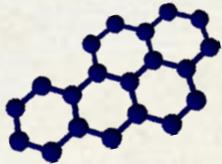
Una muestra positiva (sustancia presente a una concentración superior a un determinado nivel de concentración) proporciona una inhibición más alta que el valor de corte.

Una muestra negativa (sustancia presente a una concentración inferior a un determinado nivel de concentración) proporciona una inhibición más pequeña que el valor de corte.



RESULTADOS

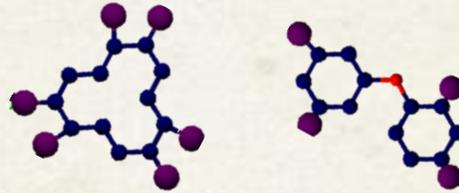
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)



Se generan durante la combustión de material orgánico.



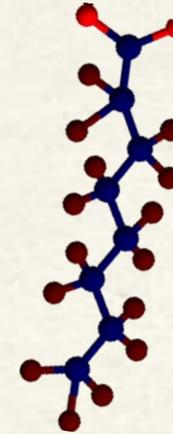
Retardantes de llama bromados (BFRs)



Se usan en diferentes tipos de objetos: dispositivos electrónicos, plásticos, productos textiles...



Compuestos perfluoroalquilados (PFAS)



Se usan como recubrimientos para producir objetos resistentes al agua, como parte de espumas antiincendios,...

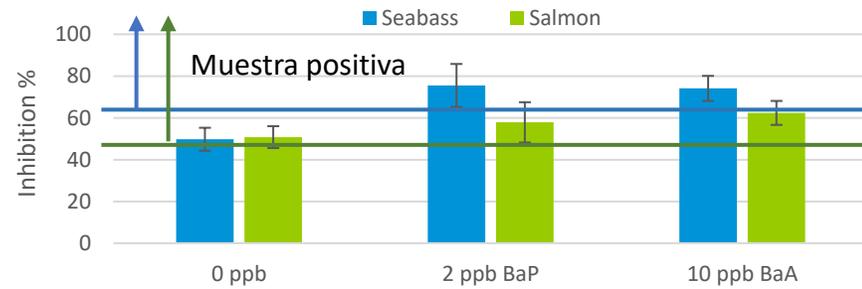


RESULTADOS

PAHs

LOD: 2 ppb BaP
10 ppb Σ 4PAH

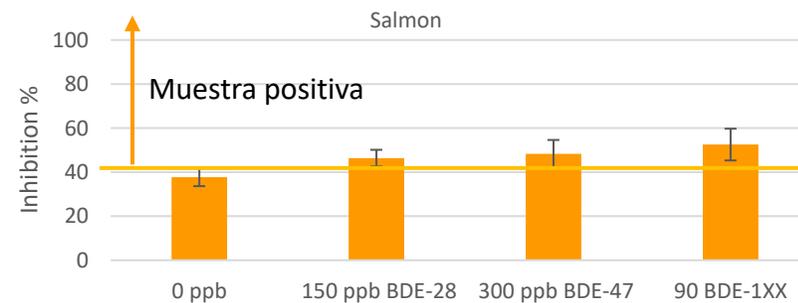
Valor de corte \approx 50% (salmón)
Valor de corte \approx 65% (lubina)



BDEs

LOD: 90 ppb BDE-100/BDE-153/BDE-154
150 ppb BDE-28/BDE-99
300 ppb BDE-47

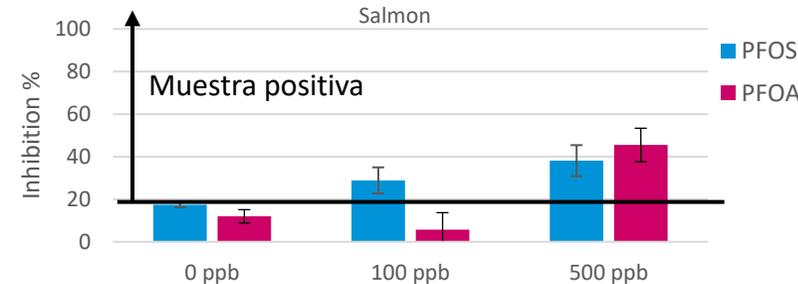
Valor de corte \approx 40%



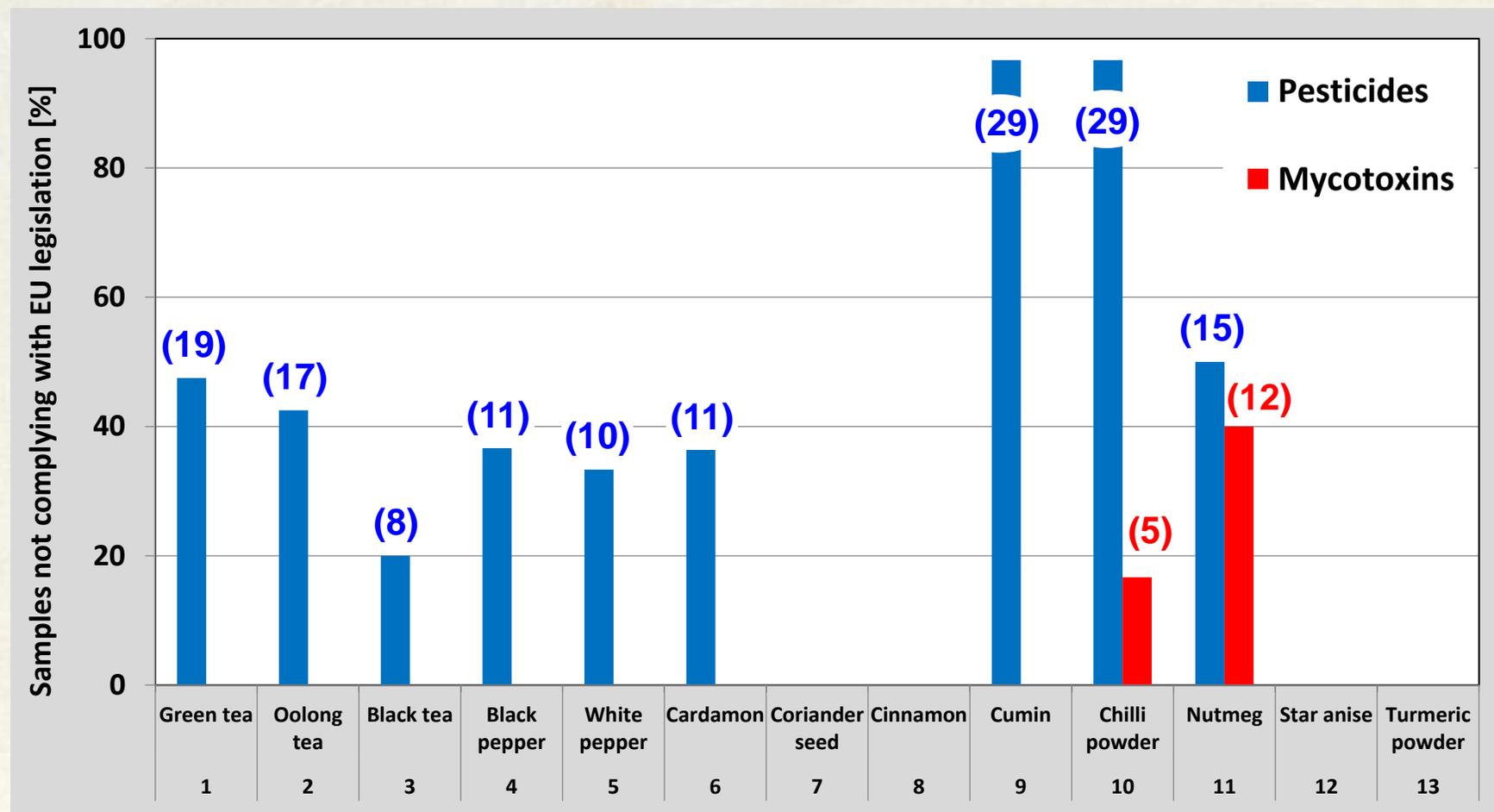
PFAS

LOD: 100 ppb PFOS
500 ppb PFOA

Valor de corte \approx 20%



RESULTADOS



RESULTADOS

Ensayo para la detección de 35 sustancias activas de diferentes familias

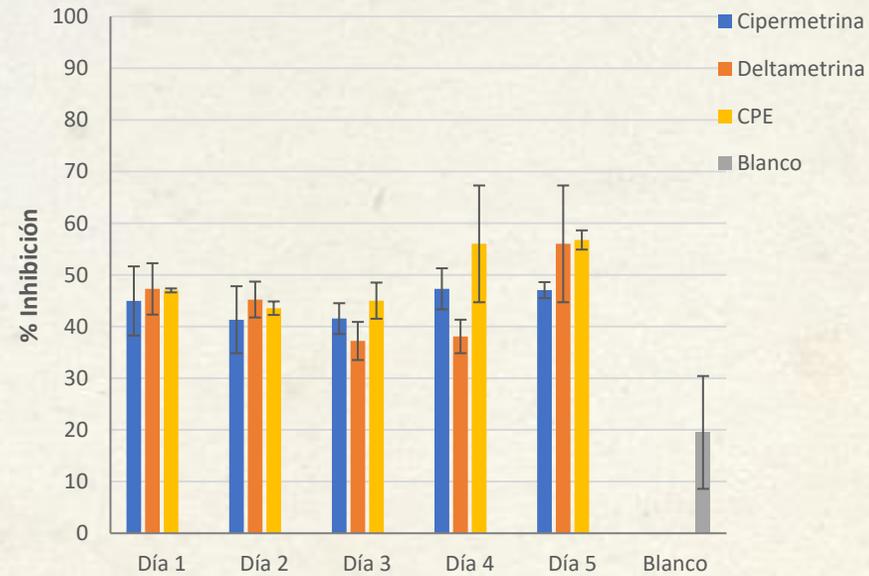
Cypermethryn	Chlorthalonil	Prochloraz	Captan
Deltamethrin	Dicofol	Propiconazole	Folpet
Chlorpyrifos	DDT	Epoxiconazole	Piperonyl butoxide
Chlorpyrifos methyl	Iprodione	Fenbuconazole	Metrafenone
Dimethoate	Procymidone	Myclobutanil	Benalaxyl
Fenitrothion	Oxamyl	Cyazofamid	Meptyldinocap
Pyrimifos metil	Mancozeb	Penconazol	Quinoxifen
Phosmet	Metiram	Triadimenol	Simazine
Diazinon	Pyraclostrobin		Diuron

Piretroides
Organosfosforado
Organoclorado
Dicarboximida
Azoles
Carbamato/Ditiocarbamato
Ftalimida
Otros



RESULTADOS

Método validado para 13 sustancias activas



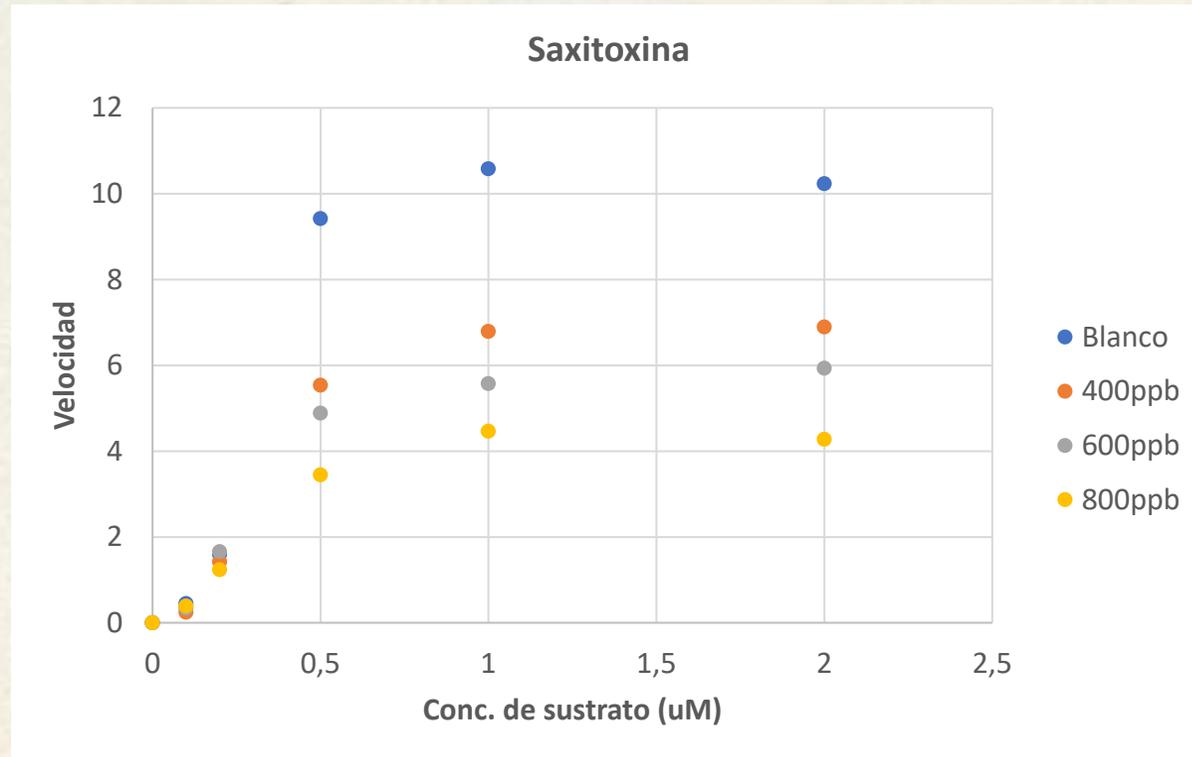
Chlorotalonil		Valor real	
		Positivo	Negativo
Resultado kit	Positivo	23	0
	Negativo	0	23

Deltametrina		Valor real	
		Positivo	Negativo
Resultado kit	Positivo	15	1
	Negativo	0	14

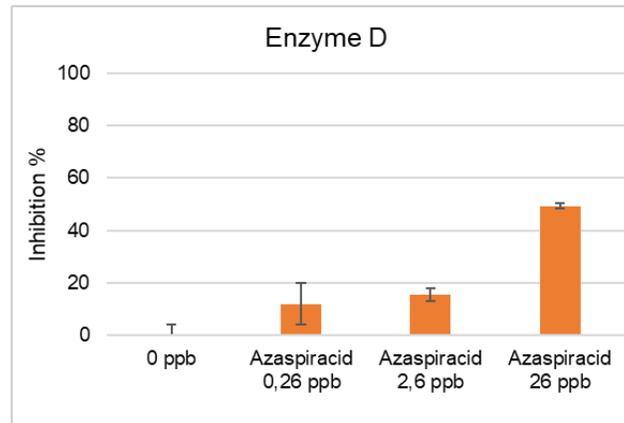
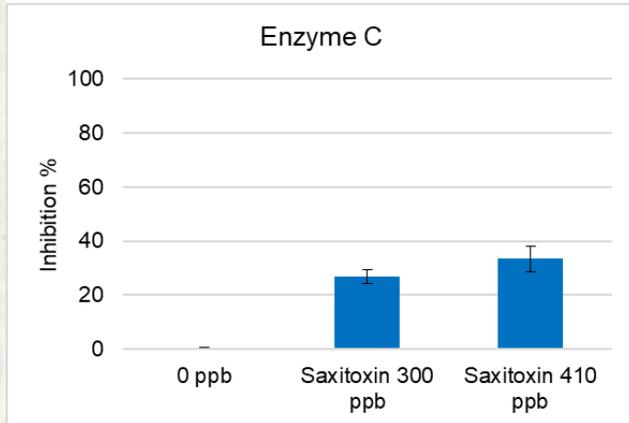
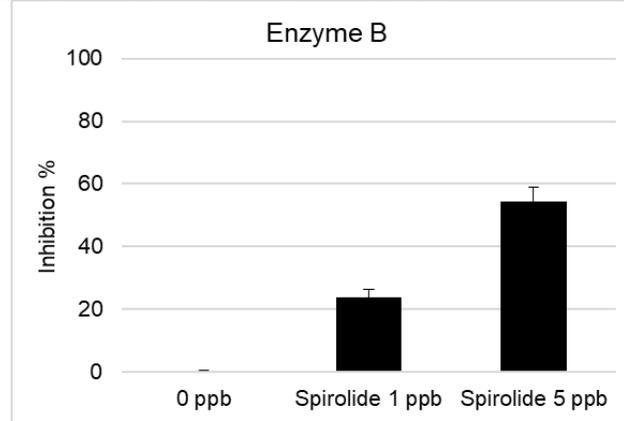
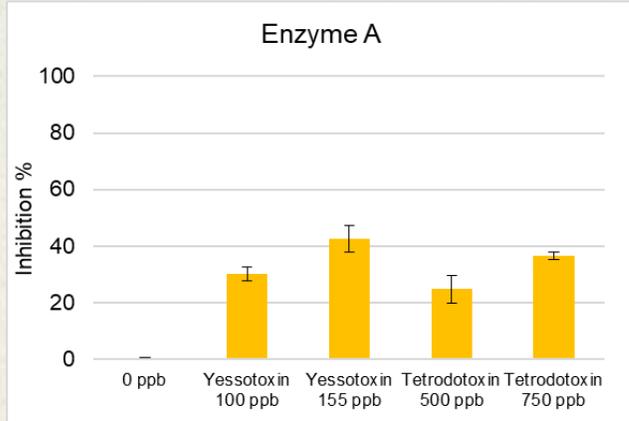


RESULTADOS

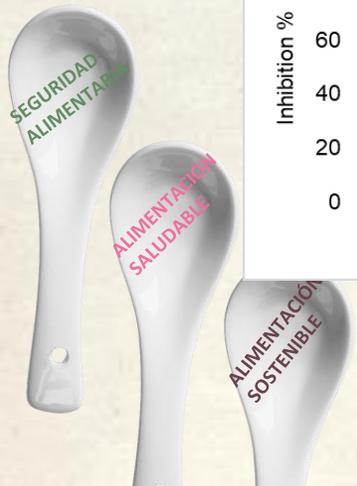
Método para la detección de toxinas marinas



RESULTADOS



Toxin	LOD (ppb)	LMR (ppb)
Saxitoxin	300	800
Yessotoxin	100	3750
Azaspiracid-1	20	160
Okadaic acid	<0,26	160
Tetrodotoxin	500	
13,19-Spirolide C	1	



CONCLUSIONES

- **Ensayos cualitativos.**

Muestra POSITIVA (contaminante presente por encima de un determinado nivel de concentración)

Muestra NEGATIVA (contaminante por debajo de un determinado nivel de concentración)

- **Tiempo de análisis.**

60-90 min, incluyendo protocolo de extracción.

- **Buena sensibilidad.**

Para algunas sustancias: HAPs, pesticidas, toxinas marinas

- **Protocolo sencillo.**

No necesita de operadores altamente cualificados

- **Análisis *in situ*.**

Posible implementación en instalaciones de la industria alimentaria.

- **Coste.**

No son necesarios reactivos ni equipamiento caro.

- **Confirmación.**

Cuando un resultado es positivo, es recomendable llevar a cabo un análisis confirmatorio (técnicas de referencia).



DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA

Folletos, instrucciones de uso, video

SEAFOOD TOMORROW
Helping Create Nutritious, Safe And Sustainable Seafood
For Consumers Of Tomorrow

Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Test Solution

Novel Qualitative Enzyme Inhibition Screening Assay

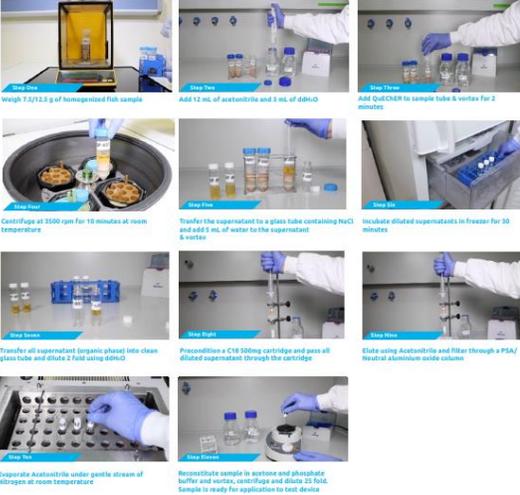


Key Benefits	Assay Information
Easy to use- no professional training required	Assay time-60 mins/96 well-plate
No laboratory required- the kits can be easily implemented in an industrial setting or in the field	Sample preparation time-20 samples/6hours
Cost effective- no need for expensive reagents or equipment	Precision & Accuracy- less than 5% false negatives
Complies with regulatory limits	No interference above maximum residue limits for: PFOs, PFOA, BFRs, Dioxins, PCBs, Pesticides
Validated for seabass & salmon	

Cross Reactivity	Limits of Detection (LODs)
Benzo(a)pyrene 100% (reference standard)	Benzo(a)pyrene: 2µg/kg
Benzo(k)fluoranthene -125%	PAH4 (sum of benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene and benzo(a)pyrene: 10µg/kg
OH-pyrene -25%	
Phenanthrene -7%	
Fluorene -5%	
Acenaphthylene -0.5%	

AZTI  **Biorex** food diagnostics

Step Process of Sample Preparation



- Step One: Weigh 7.5/12.5 g of homogenized fish sample
- Step Two: Add 12 mL of acetonitrile and 3 mL of ddH₂O
- Step Three: Add QuEChER to sample tube & vortex for 2 minutes
- Step Four: Centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature
- Step Five: Transfer the supernatant to a glass tube containing HCl and add 5 mL of water to the supernatant & vortex
- Step Six: Incubate diluted supernatant in freezer for 30 minutes
- Step Seven: Transfer all supernatant (organic phase) into clean glass tube and dilute 2 fold using ddH₂O
- Step Eight: Precondition a C18 500µm cartridge and press all diluted supernatant through the cartridge
- Step Nine: Elute using Acetonitrile and filter through a PSA/Neutral aluminum oxide column
- Step Ten: Evaporate Acetonitrile under gentle stream of Nitrogen at room temperature
- Step Eleven: Reconstitute sample in acetone and phosphate buffer and vortex, centrifuge and dilute 25 fold. Sample is ready for application to test device

Step Process of Assay Detection

1. Prepare Reaction Mixture 1 using Reagent A & B
2. Add a 80 µL of sample extract to each well
3. Add 10 µL of Reaction Mixture 1 per well and incubate for 5 minutes at 37°C and shake for 8 minutes
4. Prepare Reaction Mixture 2 using phosphate buffer, Reagent C & Reagent D
5. Measure the fluorescence of each well
6. Remove microtitre plate from incubator and add 10µl of Reaction Mixture 2 to every well. Incubate for 60 minutes at 37°C

AZTI  **Biorex** food diagnostics

<https://vimeo.com/537197799>



DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA

**ELIKAGAIEN
SEGURTASUNAREN
ARLOKO IKERKETA
EMAITZAK
TRANSFERITZEKO
IX. JARDUNALDIA
JORNADA DE
TRANSFERENCIA DE
RESULTADOS DE
INVESTIGACIÓN**

- **Presentaciones**
 - Congresos
 - Workshops
- **Patente**



Futuros trabajos

- **Protocolos de extracción**
 - Eliminación/reducción del efecto matriz.
 - Protocolos más sencillos y de fácil implementación en el análisis *in situ*.
- **Estabilidad de los bioreactivos**
 - Aumentar la vida útil en condiciones de almacenamiento posibles en las instalaciones del usuario final.
- **Métodos de transducción/configuración del kit y/o biosensor**
 - Aumentar la sensibilidad
 - Protocolos de trabajo más sencillos
- **Aumentar la capacidad de detección a más contaminantes**



Agradecimientos



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreement no. 773400 (SEAFOOD^{TOMORROW}). This output reflects the views only of the author(s), and the European Union cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

<https://seafoodtomorrow.eu/>



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 727864 and from the Chinese Ministry of Science and Technology (MOST).

<http://euchinasafe.eu/>



<https://www.alertox-net.eu/>



