



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

**Bioaccesibilidad de cianotoxinas en mejillones
mediante un modelo de digestión *in vitro***

Antonio Cascajosa Lira



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

Bioaccesibilidad de cianotoxinas en mejillones mediante un modelo de digestión *in vitro*

ANTONIO CASCAJOSA LIRA

Facultad de Farmacia, Sevilla

Julio de 2019

Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología

Tutoras: Dra. Ana María Cameán Fernández y Dra. Remedios Guzmán
Guillén

Trabajo Fin de Grado Experimental

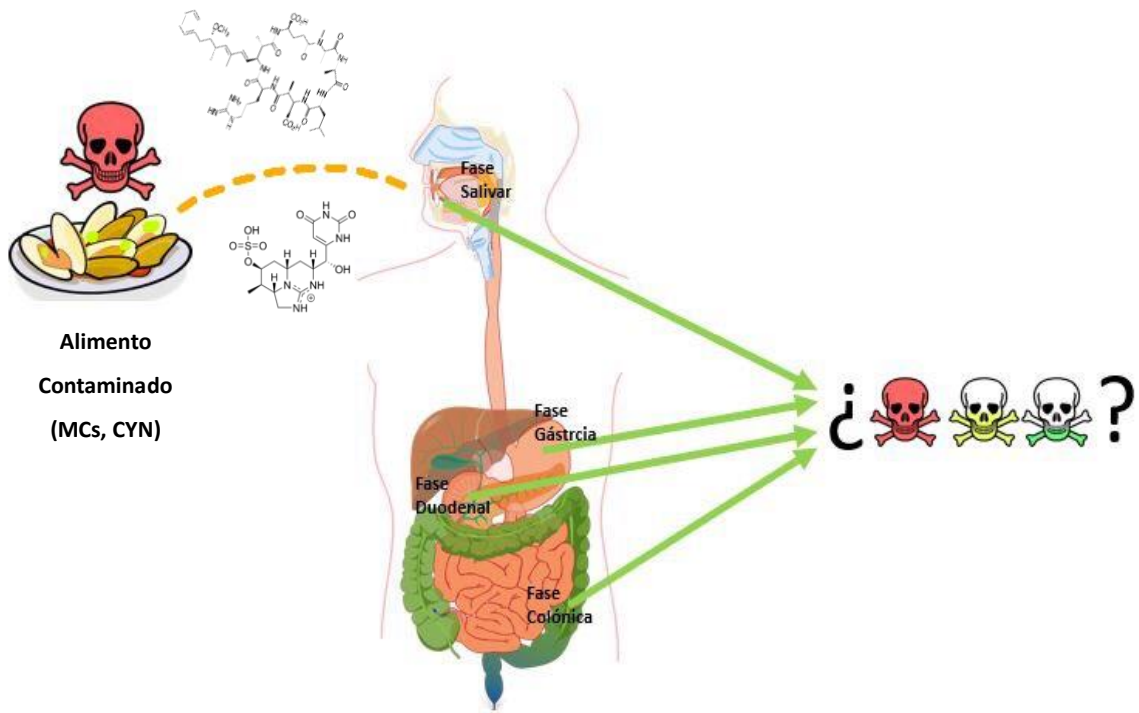
**Este trabajo ha sido realizado en el Área de Toxicología del
Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina
Legal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y ha
sido financiado por el Proyecto de Investigación AGL2015-64558-R,
MINECO/FEDER, UE.**

RESUMEN

Las cianobacterias son un diverso grupo de microorganismos procariotas cuya proliferación en masa da lugar a floraciones en las que se liberan sus metabolitos secundarios, entre los que destacamos las cianotoxinas, como las Microcistinas (MCs) y la Cilindrospermopsina (CYN), afectando así a la población expuesta, generando diferentes efectos tóxicos, además de crear problemas de índole tanto medioambiental, como económico. La vía oral mediante la ingesta de alimentos y agua contaminados con cianotoxinas es la principal vía de exposición a estas biotoxinas. Por esa razón, en el presente trabajo se aborda un estudio sobre la bioaccesibilidad de estas biotoxinas, con la finalidad de realizar una evaluación del riesgo más realista. En concreto, se aplicó un modelo de digestión *in vitro* de cuatro fases (salivar, gástrica, duodenal y colónica) sobre mejillones expuestos previamente a MC-LR, -RR, -YR y CYN a una concentración de 250 ng/g peso fresco. Los resultados obtenidos sugieren que la exposición potencial por consumo de mejillones a estas biotoxinas es menor de lo esperado, ya que a medida que estas sufren el proceso de digestión, su bioaccesibilidad desciende hasta llegar, en la última fase, aproximadamente a un 30% en el caso de la CYN, un 20% para MC-LR, un 39% para MC-RR y un 23% en el caso de la MC-YR. Se demuestra así que la bioaccesibilidad depende de varios factores como: el proceso de digestión, el cual juega un papel importante en la degradación de estas toxinas, y también la matriz del alimento, la cual puede en mayor o menor medida retener estas toxinas.

Palabras clave: Microcistinas, Cilindrospermopsina, bioaccesibilidad, digestión *in vitro*, mejillones.

RESUMEN GRÁFICO



ÍNDICE

RESUMEN	5
RESUMEN GRÁFICO	6
1. GLOSARIO	9
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS.....	3
2.2. MICROCISTINAS	5
2.3. CILINDROSPERMOPSINA.....	8
2.4. BIOACCESIBILIDAD	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL Y MÉTODO	12
4.1. REACTIVOS	12
4.2. ORGANIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	12
4.2.1. CONTROLES SIN DIGERIR	12
4.2.2. MEJILLONES DIGERIDOS	13
4.3. EXTRACCIÓN DE MCs A PARTIR DE LOS MEJILLONES.....	13
4.4. EXTRACCIÓN DE CYN A PARTIR DE LOS MEJILLONES	14
4.5. EXTRACCIÓN DE MCs Y CYN DE LAS AGUAS DEL COCINADO	14
4.6. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL) Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	15
4.7. MODELO DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	16
4.8. DETERMINACIÓN ANALÍTICA ANTES Y DESPUÉS DE LA DIGESTIÓN	17
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 CONTROLES DE TOXINA.....	19
5.2 BIOACCESIBILIDAD DE MCs	19
5.3 BIOACCESIBILIDAD DE CYN.....	23
5.4 AGUAS DE COCINADO	26
6. CONCLUSIONES	27
AGRADECIMIENTOS	28
BIBLIOGRAFÍA	29

1. GLOSARIO

BAL: Bacterias Ácido-Lácticas

BMAA: Beta-metilamino-L-alanina.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

CYN: Cilindropermopsina.

CYP450: Citocromo P450.

EFS: Extracción en Fase Sólida.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

FC: Fase Colónica.

FD: Fase Duodenal.

FDA: Food and Drugs Administration.

FG: Fase Gástrica.

FS: Fase Salivar.

GSH: Glutati6n.

GST: Glutati6n-S-transferasa.

IARC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el C6ncer.

MC: Microcistina.

OATP: Polip6ptido Transportador de Aniones Org6nicos (Organic Anion Transporting Polypeptide).

OMS: Organizaci6n Mundial de la Salud.

PGC: Carbono Grafitizado Poroso.

UPLC-MS/MS: Cromatograf6a L6quida de Ultra Alta Resoluci6n acoplada a espectrometr6a masas/masas (Ultra high Performance Liquid Chromatography).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS

Las cianobacterias son bacterias productoras de oxígeno que, junto con la radiación solar y el dióxido de carbono, son capaces de formar su biomasa, es decir, son organismos fotosintéticos. Se originaron hace 3 billones de años y fueron responsables de la oxidación de nuestra atmósfera. También son conocidas como algas verde-azuladas aunque en realidad no sean algas, este término solo está reservado para organismos eucariotas (Huisman et al., 2018). El funcionamiento bioquímico de una cianobacteria está basado en la fijación del CO₂ al igual que las plantas o las algas. (Huisman et al., 2018).

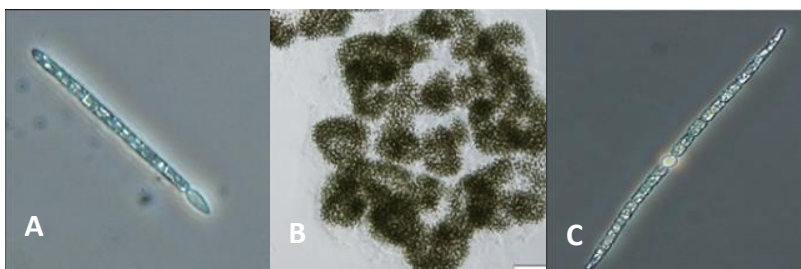


Fig. 1 Algunos ejemplos de cianobacterias. **A** *Cylindrospermopsis* sp. **B** *Microcystis* sp. **C** *Chrysochloris* sp. Fotos tomadas de Tatters et al. (2017).

El resultado de la proliferación masiva de estas bacterias se conoce como “harmful cyanobacterial algal Bloom” (cyanoHABs). Estas floraciones surgen o se manifiestan con la eutrofización, cuando el medio se enriquece con nitrógeno y fósforo, normalmente de origen antropogénico (Buratti et al., 2017). El más importante es el fósforo, ya que algunas cianobacterias pueden obtener el nitrógeno del aire; otro factor importante es tener un alto ratio fotosintético, que va directamente relacionado con el efecto invernadero y con el CO₂. (Paerl et al., 2011) (Figura 2). Estas floraciones hacen que el agua, sobre todo la superficie, se vea con un aspecto turbio y coloreado (Figura 3).

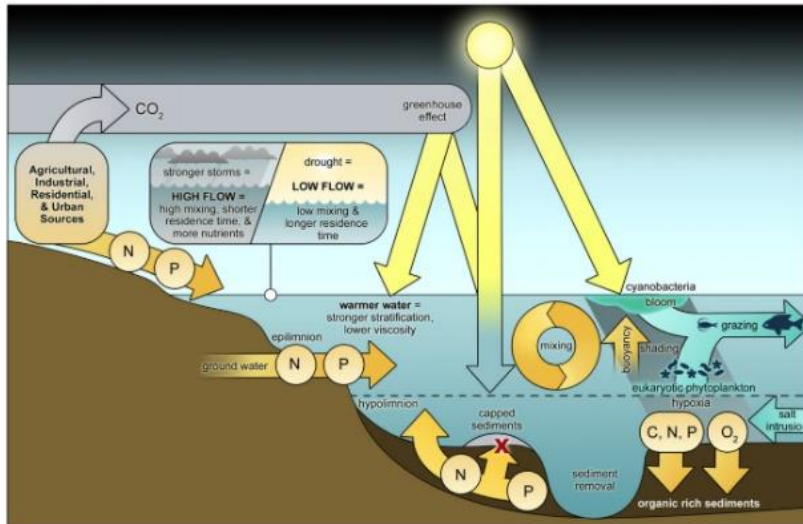


Fig. 2 Mapa conceptual, ilustrando los procesos medioambientales que intervienen en la formación de floraciones de cianobacterias. Tomada de (Paerl et al., 2011).

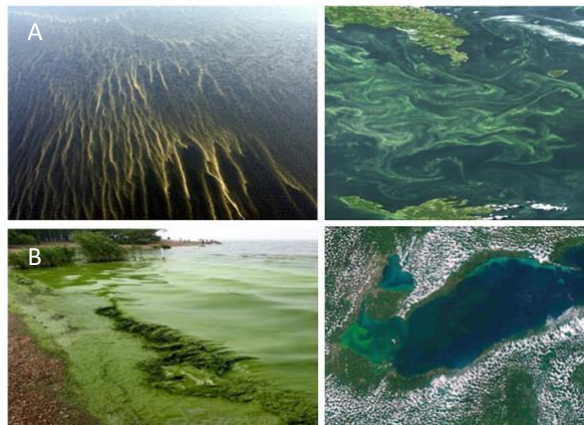


Fig. 3 Algunos ejemplos de la floración de cianobacterias. A la izquierda se muestran fotografías cercanas de la floración y a la derecha fotografías desde satélite. (A) Golfo del mar Báltico en Finlandia, junio 2005; (B) Lago Erie en EEUU durante el verano de 2009. Fotos tomadas de (Paerl et al., 2011).

Uno de los problemas que genera este crecimiento de cianobacterias es la producción de cianotoxinas, moléculas que no están implicadas en el desarrollo normal de las cianobacterias, por lo que se consideran metabolitos secundarios (Carmichael, 1992) produciendo daños a nivel ambiental, en la salud de los individuos expuestos (Paerl et al., 2011), y pérdidas económicas (Dodds et al., 2013).

Las cianobacterias que fundamentalmente han estado implicadas en incidentes toxicológicos pertenecen a los géneros: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis* y con menos frecuencia *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Nodularia* y *Nostoc* (Corbel et al., 2014). En cuanto a la clasificación de las diferentes cianotoxinas, pueden organizarse en función de su estructura química, sus efectos tóxicos principales, o el principal sistema u órgano afectado (Moreira et al., 2013). Según establece la comisión europea (JRC106478 disponible en: <http://publications.jrc.ec.europa.eu>), en función del tejido diana, pueden distinguirse:

- Hepatotoxinas: afectan principalmente al hígado, son Microcistinas (MCs) (producidas por *Microcystis* entre otros géneros) y Nodularinas (producidas por *Nostoc* y *Nodularia*), ambas de naturaleza peptídica e inhibidoras de la serina/treonina protein fosfatasas.
- Citotoxinas: afectan a las células, dañando sus orgánulos o produciendo su muerte. A este grupo pertenece la Cilindrospermopsina (CYN), producida por *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* y *Chrysoosporum* entre otros géneros.
- Neurotoxinas: su principal diana es el sistema nervioso, a este grupo pertenecen Anatoxina, Saxitoxina y Beta-metilamino-L-alanina (BMAA). Producen un amplio rango de síntomas como temblor, parálisis respiratoria, etc. Son producidas por los géneros *Cylindrospermopsis* y *Chrysoosporum* entre otros.
- Dermatotoxinas: producen irritación de la piel y problemas respiratorios. A este grupo pertenecen los lipopolisacáridos, Lyngbyatoxina y Aplysiatoxina. Producidas por géneros como *Microcystis*, *Anacystis*, *Lyngbya* o *Anabaena*.

2.2. MICROCISTINAS

Las Microcistinas (MCs) son un grupo de toxinas cuya estructura heptapeptídica cíclica se compone de aminoácidos inusuales como el Adda (ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico), único en las cianotoxinas (Díez-Quijada et al., 2019). La fórmula general de una MC es ciclo(D-Ala-L-X-D-eritro-β-metilAsp-L-Z-Adda-D-Glu-N-metil-dehidro-Ala) donde X y Z, posiciones 2 y 4

respectivamente, son aminoácidos variables (Carmichael, 1992) (Figura 4). Esta y otras posibles variaciones dentro de la molécula hace que se hayan identificado más de 246 tipos diferentes de MCs (Meriluoro et al., 2017), aunque las más habitualmente encontradas en la naturaleza son MC-LR, MC-RR y MC-YR (Svircev et al., 2017), nombradas según la abreviación de los aminoácidos que las componen. MC-LR presenta un residuo de leucina (L) y otro de arginina (R) en la posición 2 y 4 respectivamente, MC-RR presenta dos residuos de arginina tanto en 2 como en 4 y MC-YR presenta un residuo de tirosina (Y) en la posición 2 y otro de arginina en la posición 4 (Figura 4).

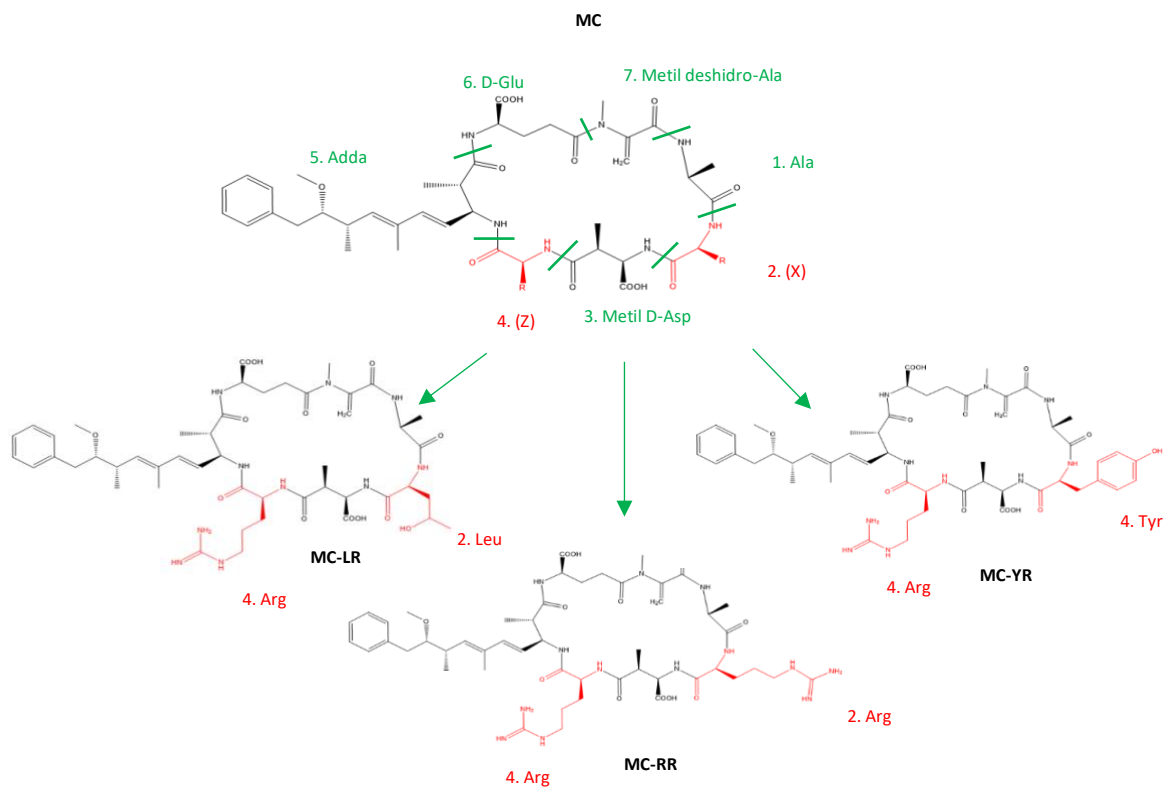


Fig. 4 Estructura general de la MC, MC-LR, MC-RR, MC-YR en la que se muestra la diferente composición de aminoácidos. Diseños moleculares realizados por el autor.

Las MCs son potentes inhibidores de las fosfatasa de proteínas, en concreto de las fosfatasa PP2A y PP1, presentes fundamentalmente en el hígado (Mackintosh et al., 1990). Llegan al hígado mediante transportadores de la superfamilia polipéptidos

transportadores de aniones orgánicos (OATPs), en concreto OATP1B2, OATP1B1, y OATP1B3, de ahí que sean consideradas extremadamente hepatotóxicas (Svircev et al., 2017), pero también afectan a otros tejidos de mamíferos donde puede ejercer de promotor tumoral como el tejido pulmonar, nervioso o reproductivo (Chen et al., 2015), dando lugar a un gran rango de posibles efectos tóxicos (Huisman et al., 2018). Otros mecanismos de toxicidad de las MCs son la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), modificaciones del citoesqueleto, inducción de apoptosis y reducción de la reparación del ADN (Buratti et al., 2017).

Microcystis aeruginosa fue la primera cianobacteria de la que se aislaron las MCs (Carmichael, 1992) pero más tarde se han aislado de muchos otros microorganismos, destacando los géneros *Fischerella*, *Nostoc*, y *Dolichospermum*. Las MCs se encuentran mayoritariamente de forma intracelular, a diferencia de otras cianotoxinas, y se encuentran disueltas en el medio una vez que se produce la lisis celular de la cianobacteria, por lo que la principal vía de exposición a MCs es el consumo de agua contaminada (Buratti et al., 2017). Uno de los casos más graves de intoxicación por MCs se declaró en Brasil en 1996 en el que se produjeron 26 muertes por fallo hepático a causa de la contaminación por MCs del agua usada en un centro de hemodiálisis (Jochimsen et al., 1998).

La legislación vigente en España establece un valor guía para MCs en aguas de bebida de 1 µg/L (Real Decreto 140/2003, de 7 de Febrero), al igual que lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y no existiendo contenidos máximos en alimentos legislados. La IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) la ha clasificado dentro del grupo 2B como “posiblemente carcinógena para humanos”. En otros países de Europa se han establecido otros niveles permitidos de MCs en aguas recreacionales, en Francia e Italia se toleran hasta 25 µg/L, en Alemania en cambio hasta 10 µg/L (Buratti et al., 2017).

2.3. CILINDROSPERMOPSINA

La Cilindropermopsina (CYN) es un alcaloide tricíclico compuesto por un grupo guanidinio y un grupo sulfato combinado con un hidroximetiluracilo. Como consecuencia de esta estructura puede generarse un zwitterion que le proporciona una mayor solubilidad en agua (Pichardo et al., 2017). La CYN fue el primer miembro de un grupo de alcaloides aislados del que actualmente se conocen 4 estructuras más (Cartmell et al., 2017) (Figura 5).

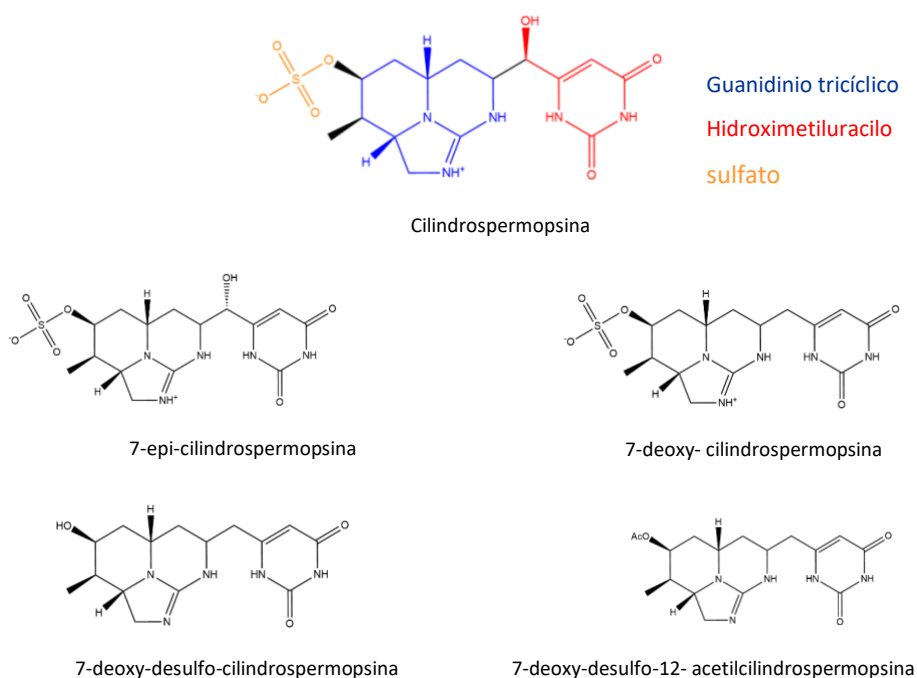


Fig. 5 Estructuras químicas de la CYN y de sus derivados posteriormente descubiertos. Diseños moleculares realizados por el propio autor.

Esta toxina se descubrió originariamente en *Cylindropermopsis raciborskii* pero hoy en día se conocen muchas más especies que son capaces de producirla, como *Chrysochloris ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata*, *Umezakia natans*, *Lyngbya wollei* y *Anabaena lapponica* (Griffiths y Saker, 2003; Akcaalan et al., 2014). El primer caso documentado de una intoxicación humana con CYN se data en 1979 en Palm Island (norte de Queensland, Australia), donde más de 100 personas tuvieron que ser hospitalizadas durante una floración de *C. raciborskii* mostrando serios síntomas gastrointestinales y hepáticos (Bourke et al., 1983; Griffiths y Saker, 2003). Las

concentraciones extracelulares de esta toxina son mucho mayores que en el caso de las MCs por lo que la principal vía de exposición es el agua contaminada, aunque también puede ocurrir mediante la ingesta de alimentos (pescado, marisco o vegetales) o suplementos alimenticios a base de cianobacterias que estén contaminados con las cianotoxinas (Buratti et al., 2017).

Es una citotoxina cuyos principales órganos diana son el hígado y el riñón ya que para introducirse dentro de las células ha de usar transportadores de ácidos biliares (e.g. cholate y taurocholate) (Chong et al., 2002), aunque también se ha comprobado que usa la difusión pasiva para entrar en las células, probablemente debido a su pequeño peso molecular. También puede causar daño a otros órganos o sistemas tal y como se muestra en diversos estudios histopatológicos en mamíferos y peces (Falconer y Humpage, 2009; Guzmán-Guillén et al., 2015). Parece ser que puede sufrir una bioactivación por acción del citocromo P450 (CYP450), dando lugar a un metabolito/s aún desconocido/s, pero más tóxico, al observarse un mayor daño en la zona periacinar del acino hepático, donde hay un mayor metabolismo por parte del CYP450 (Buratti et al., 2017).

Entre sus mecanismos de toxicidad se encuentran la inhibición de la síntesis de proteínas y del glutatión, estrés oxidativo, provocando oxidación de lípidos, proteínas y ADN, neurotoxicidad (Guzmán-Guillén et al., 2014, 2015; Pichardo et al., 2017; Hinojosa et al., 2019) y genotoxicidad (Bazin et al., 2007). No resulta ser mutagénica y tampoco produce roturas del ADN *in vitro* (Puerto et al., 2018).

Actualmente en España no existe una legislación que controle los niveles de CYN permitidos en aguas de consumo humano, aunque algunos autores han propuesto un nivel guía de 1 µg/L (Humpage y Falconer, 2003). La IARC actualmente tampoco ha clasificado la CYN dentro de ninguno de sus grupos según su carcinogenicidad.

2.4. BIOACCESIBILIDAD

Debe tenerse en cuenta la influencia que puede tener en la concentración de las cianotoxinas el procesado y el cocinado de los organismos contaminados con estas y que son destinados a consumo humano (Freitas et al., 2014; Maisanaba et al., 2017). Además, la cantidad ingerida no siempre coincide con la cantidad que queda disponible para ser absorbida por el organismo, ya que existe la posibilidad de degradación o modificación mediante algún proceso metabólico, dejando solo una fracción de la cantidad inicial accesible para ser absorbida, lo que se conoce como bioaccesibilidad (Bordin et al., 2016).

La bioaccesibilidad de MC-LR ha sido estudiada en almejas (Freitas et al., 2014), y la de CYN aislada ha sido evaluada en mejillones por digestión salivar, gástrica y duodenal (Freitas et al., 2016) y en pescado y vegetales (Maisanaba et al., 2017, 2018) incluyendo, además, una digestión colónica, simulando así el paso por todo el tubo digestivo humano y comprobando cómo afecta todo este proceso a la cantidad de toxina que pueda ser posteriormente absorbida. Sin embargo, actualmente no hay estudios sobre la bioaccesibilidad conjunta de MCs y CYN, lo que es un aspecto importante a tener en cuenta, debido a la existencia de floraciones mezcladas en la naturaleza que crean una exposición conjunta a ambas (Minasyan et al., 2018).

3. OBJETIVOS

Evaluar la bioaccesibilidad de MCs (MC-LR, -RR e -YR) y CYN conjuntamente en mejillones crudos y cocinados, mediante un modelo de digestión *in vitro* que incluya cuatro fases: salivar, gástrica, duodenal y colónica.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. REACTIVOS

Las tres variantes de MCs empleadas (MC-LR, MC-RR, MC-YR) (99% de pureza) y CYN (95% de pureza) fueron suministrados por Enzo Life Sciences (Lausen, Suiza) y resuspendidas en 100% MeOH en el caso de MC-LR e -YR, 80% MeOH en caso de MC-RR y agua Milli-Q (resistividad < 18 MΩ.cm; Milipore, Bedford, MA, USA) en el caso de CYN. Se utilizaron los siguientes disolventes: acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), ácido trifluoroacético (TFA), ácido acético (AA), ácido fórmico (FA), los cuales se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Los cartuchos BOND ELUT[®] de carbono grafitizado (columna de PGC) (500mg, 6mL) y Bakerbond[®] C18 (500mg, 6mL) fueron suministrados por Agilent Technologies (Holanda, Europa) y Dicsa (Andalucía, Spain), respectivamente. Para la digestión *in vitro*: ácido fórmico (HCOOH), cloruro potásico (KCl), tiocianato de potasio (KSCN), dihidrogenofosfato de sodio (NaH₂PO₄), sulfato de sodio (Na₂SO₄), cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato sódico (NaHCO₃), urea, α-amilasa, mucina, ácido clorhídrico (HCl), pepsina, pancreatina y sales biliares que se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El medio de cultivo bacteriano MRS fue suministrado por Oxoid (Madrid, España).

4.2. ORGANIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

4.2.1. CONTROLES SIN DIGERIR

Los mejillones frescos fueron comprados en el supermercado y traídos al laboratorio, donde se limpiaron, se separaron de las conchas, y se eliminó el líquido en la medida de lo posible. Se utilizaron como matriz para construir rectas patrones de MCs y de CYN, extrayendo la matriz como se describe en los apartados 3.3 y 3.4, resuspendiendo los extractos a las concentraciones deseadas de toxinas (10, 25, 50, 100, 200 y 400 µg/L).

A los mejillones (2 g peso fresco, p.f., n=6) se le añadió 250 µL de una solución multitoxina (MC-LR, MC-RR, MC-YR, CYN) de 2000 µg/L para alcanzar 250 ng/g p.f., de

manera homogénea y dejándolo a temperatura ambiente 30 minutos. A continuación, 3 de estos mejillones fueron dejados como controles sin cocinar (grupo 1) y los otros 3 fueron cocinados al vapor durante 2 minutos (grupo 2), tomando muestras del agua de cocinado para su análisis, como se indica en el apartado 3.5. Posteriormente, cada mejillón se repartió en dos porciones de 1 g p.f. cada uno para la extracción y detección de MCs en una porción, y de CYN en la otra (apartados 3.3 y 3.4, respectivamente).

4.2.2. MEJILLONES DIGERIDOS

Para determinar la bioaccesibilidad de MCs y CYN a los mejillones (2,5 g p.f., n=6) se les añadió la solución multitoxina (MC-LR, MC-RR, MC-YR, CYN) para alcanzar 250 ng/g p.f. A continuación, 3 de las muestras se dejaron como controles sin cocinar de la digestión (grupo 3) y las otras 3 fueron cocinadas (vapor, 2 min, grupo 4).

También se realizó una digestión de mejillones sin toxina para construir una recta matriz en cada una de las 4 fases digestivas.

Tabla 1: Organización de los diferentes grupos experimentales.

	1	2	3	4
COCINADO	-	+	-	+
DIGERIDO	-	-	+	+

Además, se incluyeron 3 controles de toxina pura, sin matriz de mejillón, a igual concentración de toxina: sin cocinar ni digerir, sin cocinar y digerida, y cocinada y digerida.

4.3. EXTRACCIÓN DE MCs A PARTIR DE LOS MEJILLONES

Para la extracción de MCs de los grupos 1 y 2, se siguió el protocolo descrito por [Freitas et al. \(2014\)](#) con algunas modificaciones: a 1 g p.f. se le añadieron 5 mL de 50% MeOH, se sonicaron (10 min) y se agitaron (10 min), se centrifugaron (15 min, 4°C, 3700 rpm), se recogió el sobrenadante y se volvió a extraer el pellet; se unieron ambos

sobrenadantes y se sometieron a un proceso de purificación con cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) de C18. El cartucho se acondicionó con 10 mL de 100% MeOH, 10 mL de agua Milli-Q y 10 mL de 20% MeOH, después se pasaron las muestras y se limpiaron con 10 mL de 20% MeOH, para eluir con 10 mL de 80% MeOH. Se llevaron al rotavapor hasta su completa sequedad para posteriormente ser resuspendidas en 1 mL de 50% MeOH.

4.4. EXTRACCIÓN DE CYN A PARTIR DE LOS MEJILLONES

Para la extracción de CYN de los grupos 3 y 4 se siguió el protocolo descrito por [Freitas et al. \(2016\)](#) con algunas modificaciones especialmente para la extracción en fase sólida (EFS) ([Guzmán-Guillén et al., 2015](#)). A 1 g p.f. de mejillón se le añadieron 5 mL de ACN al 90%, se sonicaron (15 min) y se agitaron (10 min), se centrifugaron (15 min, 4°C, 3700 rpm), se recogió el sobrenadante y se volvió a extraer el pellet. Se juntaron ambos sobrenadantes y se sometieron a un proceso de purificación con cartuchos PGC (carbono grafitizado poroso). El cartucho se acondicionó con 10 mL de 100% MeOH + 0.1% de TFA y 10 mL de agua Milli-Q, se pasaron las muestras y 10 mL de agua Milli-Q para limpiar, finalmente, se eluyeron con 16 mL de 100% MeOH + 0.1% de TFA. Se llevaron al rotavapor hasta su completa sequedad y se resuspendieron en 1 mL de agua Milli-Q, previo a su análisis por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría masas/masas (UPLC-MS/MS).

4.5. EXTRACCIÓN DE MCs Y CYN DE LAS AGUAS DEL COCINADO

Las MCs y CYN se extrajeron de las aguas del cocinados siguiendo el método de [Zervou et al. \(2017\)](#). A 1 g p.f. se le añadieron 10 mL de 80% MeOH, se sonicaron (15 min) y se agitaron (15 min), se centrifugaron (15 min, 4°C, 3700 rpm), se recogió el sobrenadante y se volvió a realizar una segunda extracción repitiendo los últimos 4 pasos, se unieron los dos sobrenadantes y se llevaron hasta pH 11. Posteriormente se sometieron a un proceso de purificación con cartuchos de EFS en la que se acopla el cartucho de PGC (inferior) con el cartucho de C18 (superior), se acondicionan con 6 mL de DCM, 6 mL de MeOH, 6 mL de agua Milli-Q a pH 11, posteriormente se pasan las muestras y se dejan secar los cartuchos durante 5 minutos. Antes de la elución se

inviertió el orden de los cartuchos: PGC (superior) y C18 (inferior), se eluyeron las muestras con 10 mL de DCM/MeOH (40/60) +0.5% FA, se llevaron hasta la completa sequedad en el rotavapor y se resuspendieron en 1mL de 20% MeOH. Finalmente se analizó mediante UPLC-MS/MS.

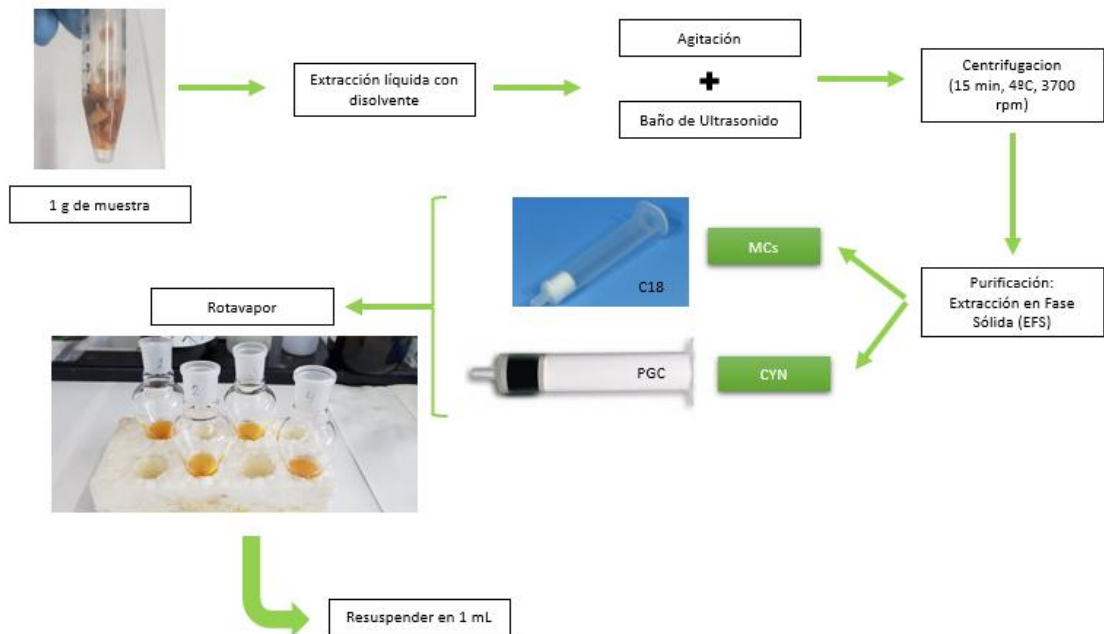


Figura 6. Esquema del proceso de extracción general. Realizado por el propio autor.

4.6. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL) Y CONDICIONES DE CULTIVO

La selección de cepas bacterianas y sus condiciones de crecimiento fueron descritas por Maisanaba et al. (2017). Estas cepas suelen encontrarse en el intestino delgado e incluyen un gran número de géneros, siendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los dos más representativos y predominantes: *Lactobacillus casei* CECT 4180, *Lb. Casei rhamnosus* CECT 278T, *Lb. plantarum* CECT 220, *Lb. delbur sub bulgaricus* CECT 4005, *Lb. Salivarius* CECT 4305, *Lb. johnsoni* CECT 289 y *Bifidobacterium breve* CECT 4839T y *B. bifidum* CECT 870T. Todas ellas fueron obtenidas de la colección española de cultivos tipo (CECT, Valencia, España) en una solución al 18% de glicerol estéril, fueron conservadas a -80°C hasta su uso, pasando por una etapa de crecimiento con dos subcultivos consecutivos antes de su uso.

4.7. MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

Las muestras de mejillón (2,5 g p.f.) de los grupos 3 y 4 (sin cocinar y cocinados, respectivamente), así como del mejillón sin toxina y de los 3 controles de toxinas fueron sometidos al siguiente proceso de digestión *in vitro* que se muestra en la figura 7, de acuerdo con lo descrito por [Maisanaba et al. \(2018\)](#), con algunas modificaciones.

- Fase salivar: a 2,5 g p.f. de mejillones crudos y cocinados y a 2,5 mL de solución multitoxina se le añadió en una bolsa de digestión 21 g de agua y 1,5 mL de la solución de saliva artificial hasta llegar a 25 g. La saliva artificial se compuso de: 10 mL de KCl (89,6 g/L), 10 mL de KSCN (20 g/L), 10 mL de NaH₂PO₄ (88,8 g/L), 10 mL de Na₂SO₄ (57 g/L), 1,7 mL de NaCl (175,3 g/L), 20 mL de NaHCO₃ (84,7 g/L), 8 mL de urea (25 g/L), a la mezcla obtenida se le añadió 0,29 g de amilasa y 0,025 g de mucina. Esta mezcla se llevó hasta 500 mL con agua destilada. La bolsa con la muestra de alimento y solución multitoxina se introdujo y se homogeneizó en el masticador (Stomacher, IUL instruments, Barcelona, España) para simular el proceso de masticación durante 30 segundos, y se tomó posteriormente una alícuota de 2 mL de esta fase.
- Fase gástrica: la mezcla resultante de la fase anterior se pasó a un matraz Erlenmeyer llevándose hasta pH 2, se añadió la pepsina y se llevó de nuevo a un peso final de 25 g. Se incubó en un agitador orbital durante 2 horas a 37°C (Figura 8) simulando las condiciones fisiológicas. Pasado ese tiempo, se tomó una alícuota de 5 mL de esta fase.
- Fase duodenal: se incrementó el pH de la mezcla resultante de la fase anterior hasta 6,5. Se le añadió la mezcla de pancreatina y sales biliares y se llevó de nuevo a un peso final de 25 g. Se incubó durante 2 horas y 37°C en el agitador orbital. Pasadas las 2 horas se tomó una alícuota de 5 mL.
- Fase colónica: para esta fase se tomaron 20 mL de la fase anterior y se incrementó el pH hasta 7,2 y a continuación se agregó 1 mL de una solución de BAL con una densidad de 1x10⁸ UFC/mL. Posteriormente se incubó en condiciones de

anaerobiosis durante 48 horas, y finalmente se tomó una alícuota de 1 mL para analizar.

Las alícuotas tomadas en todas estas fases se centrifugaron (10 min, 4°C, 4500 rpm) y su sobrenadante fue filtrado (0,22 µm) antes de ser analizado por UPLC-MS/MS.

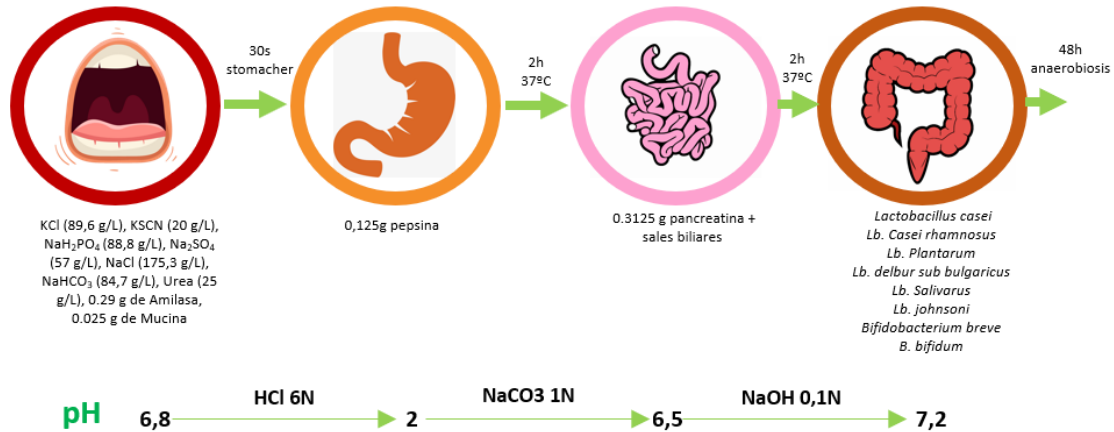


Figura 7. Esquema del modelo de digestión *in vitro*. Realizado por el propio autor.



Figura 8. Proceso de incubación de las fases digestivas a 37°C en el agitador orbital. Realizado por el propio autor.

4.8. DETERMINACIÓN ANALÍTICA ANTES Y DESPUÉS DE LA DIGESTIÓN

La separación cromatográfica se llevó a cabo usando UPLC Acquity (Waters) acoplado a Xero TQ-S micro (Waters, Milford, MA, USA), que consiste en un Espectrómetro de masas triple cuadrupolo, equipado con electrospray con fuente de iones en positivo. El análisis con UPLC fue llevado a cabo sobre una columna: 100 x 2,1 mm XSelect HSS T3 2,5 µm y con un flujo de 0,45 mL min⁻¹ usando un gradiente binario

que consistía en agua (A) y acetonitrilo (B), ambos con un 0,1% de ácido fórmico. El volumen de muestra inyectado fue de 5 µl y el perfil de disolventes usados para la elución fue: 2% B (0,8 min), un gradiente lineal hasta 70% B (6,2 min), 100% B (1 min), y, finalmente, 2% B (2 min). Se aplicó la monitorización de reacciones múltiples (MRM) en la que los pares de iones y los fragmentos ionizados fueron monitorizados en Q1 y Q3, respectivamente. Para el análisis de UPLC-ESI-MS/MS se establecieron los siguientes parámetros optimizados: voltaje capilar: 1,0 kV, fuente de temperatura: 500°C, flujo de gas desolvatante: 1000 L/h, y flujo de gas cónico: 50 L/h.

Las transiciones empleadas para MC-LR fueron 996,5/135,0, 996,5/213,1, y 996,5/996,5; para MC-RR: 520,2/135,0 y 1039,5/135,0; para MC-YR: 1046,5/135,0, 1046,5/213,0, y 1046,5/1046,5; y, finalmente, para CYN: 416,2/194,0 y 416,2/176,0, siendo la primera de ellas elegida para cuantificar y las otras para confirmar, por cada toxina.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico INSTAT, Graph Pad™ y representan la media ± desviación estándar (SD) de muestras por grupo. Las diferencias entre las medias de los diferentes grupos se evaluaron con el test de Tukey.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante mencionar que las concentraciones evaluadas a lo largo de todo el presente trabajo representan la toxina en forma libre, sin tenerse en cuenta la toxina intracelular o unida a macromoléculas.

5.1 CONTROLES DE TOXINA

Los resultados de los controles de toxina pura, exentos de la matriz y sus efectos sobre la bioaccesibilidad, fueron, en el caso de la CYN una disminución del 41,35% y 41,92% en los grupos sin cocinar y cocinado, respectivamente, dándose esta disminución principalmente en la fase colónica. Y en el caso de las MCs, se observa que solo la MC-LR y MC-YR disminuyen los contenidos: la MC-YR disminuye un total de 20,43% y un 24,92% en los grupos sin cocinar y cocinado, respectivamente, y para la MC-LR se observó una disminución del 34,74% y un 37,65% en los grupos sin cocinar y cocinado, respectivamente y, al igual que en el caso de CYN, principalmente en la fase colónica.

En definitiva, si se comparan estos resultados con los obtenidos en la bioaccesibilidad que se muestran más adelante, las MCs muestran un efecto matriz mayor que la CYN, al ser las MCs moléculas peptídicas y mayores que la CYN es posible que puedan establecer más enlaces intermoleculares con las macromoléculas de la matriz del mejillón.

5.2 BIOACCESIBILIDAD DE MCs

Se han expresado ambos controles (cocinado y sin cocinar) con un valor del 100% a pesar de que el control cocinado ha sufrido una pérdida del 39,92% con respecto al que no está cocinado. En el caso de las MCs se observan resultados muy parecidos entre ellas (figuras 9-11). En el caso de la MC-LR se obtuvo en la fase salivar un valor de bioaccesibilidad de $55,26 \pm 16,60$ % en el grupo sin cocinar y $42,22 \pm 3,46$ % en el grupo cocinado, pasando a sus valores más bajos en la fase colónica con $20,94 \pm 4,29$ % y $21,98 \pm 0,52$ % en los grupos sin cocinar y cocinado, respectivamente (Figura 9).

En el caso de la MC-RR, durante el cocinado de los mejillones se perdió un 24,14%. Se alcanzó $68,94 \pm 18,74$ % y $46,75 \pm 2,73$ en la fase salivar para los grupos sin cocinar y cocinado, respectivamente, llegando a la fase colónica con $36,50 \pm 5,26$ % y $41,54 \pm 1,99$ % (Figura 10). Y, por último, para MC-YR, se obtuvo una pérdida durante el cocinado de los mejillones de 39,92%, y se alcanzó un valor de bioaccesibilidad en la fase salivar de $62,05 \pm 15,19$ % y $40,04 \pm 5,32$ % (sin cocinar y cocinado respectivamente), llegando hasta $21,56 \pm 4,95$ % y $26,11 \pm 3,00$ % en la fase colónica (Figura 11).

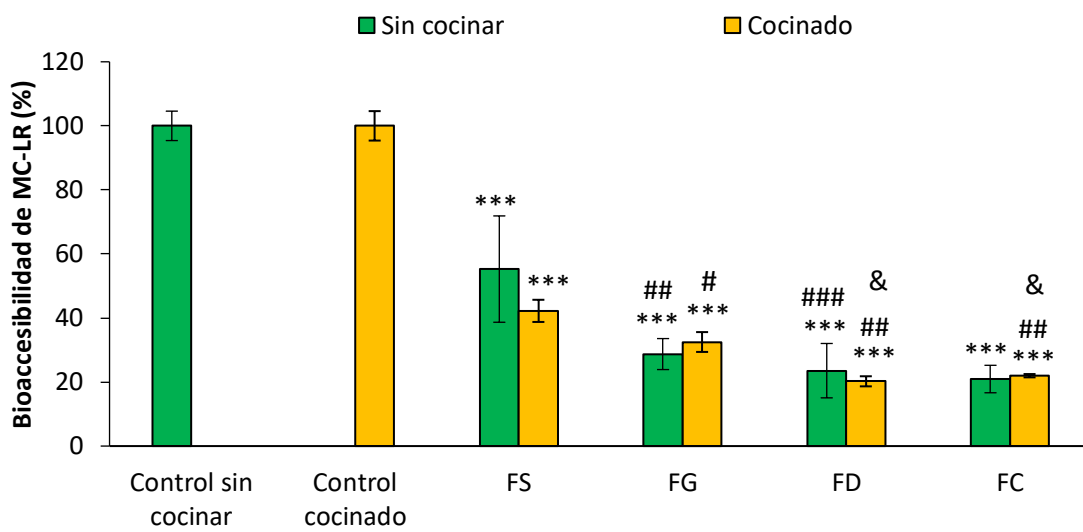


Fig 9. Porcentaje de bioaccesibilidad de MC-LR en los controles y las diferentes fases digestivas en función de su respectivo grupo control (sin cocinar o cocinado). *** ($p < 0,001$) diferencias estadísticamente significativas comparando con su respectivo control; # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$), ### ($p < 0,001$); diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase salivar; & ($p < 0,05$) diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase gástrica. FS: fase salivar; FG: fase gástrica; FD: fase duodenal; FC: fase colónica.

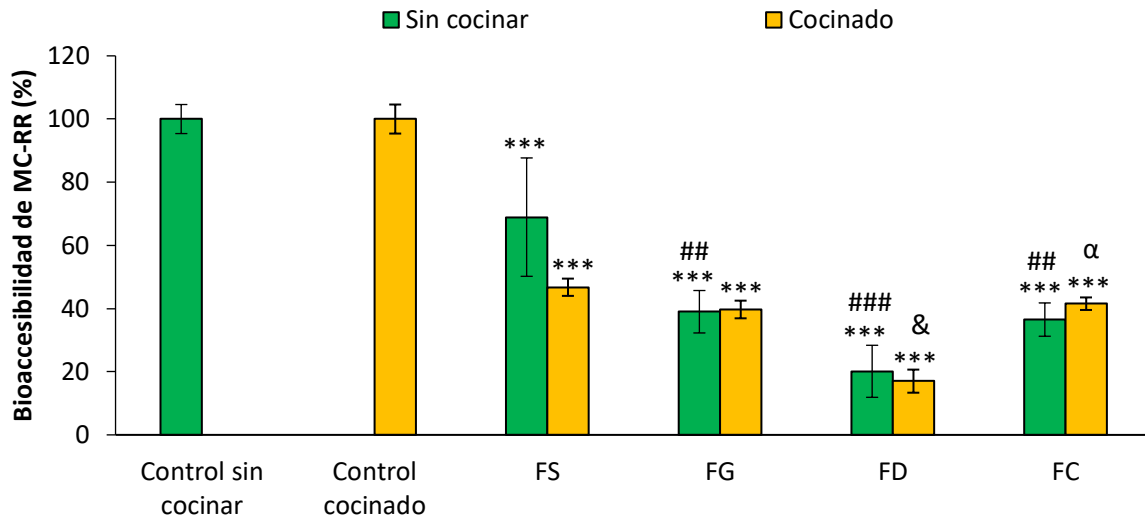


Fig 10. Porcentaje de bioaccesibilidad de MC-RR en los controles y las diferentes fases digestivas en función de su respectivo grupo control (sin cocinar o cocinado). *** ($p < 0,001$) diferencias estadísticamente significativas en la fase digestiva comparando con su respectivo control; ## ($p < 0,01$), ### ($p < 0,001$) diferencias estadísticamente significativas en la fase digestiva comparando con la fase salivar; & ($p < 0,05$) diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase gástrica; α ($p < 0,05$) diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase duodenal. FS: fase salivar; FG: fase gástrica; FD: fase duodenal; FC: fase colónica.

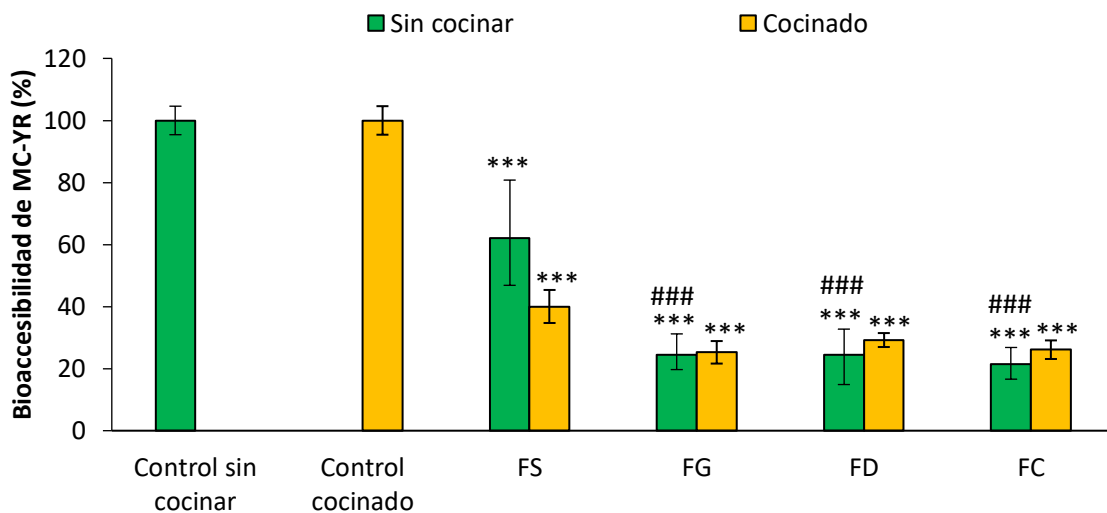


Fig 11. Porcentaje de bioaccesibilidad de MC-YR en los controles y las diferentes fases digestivas en función de su respectivo grupo control (sin cocinar o cocinado). *** ($p < 0,001$) diferencias estadísticamente significativas comparando con su respectivo

control; ### ($p < 0,001$) diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase salivar. FS: fase salivar; FG: fase gástrica; FD: fase duodenal; FC: fase colónica.

Ningún trabajo anteriormente ha descrito la bioaccesibilidad de la MC-RR ni de la MC-YR tras pasar por un proceso digestivo tan completo como el realizado en este trabajo, y tampoco se han realizado estudios utilizando la matriz de mejillón. Por tanto, es la primera vez que se obtiene la bioaccesibilidad de estas dos toxinas, junto a MC-LR y CYN, tras la completa simulación por el paso de un tubo digestivo.

La pérdida de toxina durante el cocinado es debida a que la toxina puede pasar al agua o bien que ésta sea termolábil. Estos resultados se pueden comparar a los que obtuvo [Guzmán-Guillén et al. \(2011\)](#) en pescados que perdían entre un 40-60% de MCs durante el proceso de cocinado.

Tanto la MC-LR como MC-RR e -YR experimentan una bajada importante de la bioaccesibilidad tras pasar por la fase salivar, siendo el caso más acentuado el de la MC-LR. Una posible explicación para esta disminución es que las MCs se unen a la matriz del mejillón.

En cuando a la fase gástrica, las MCs muestran un descenso significativo con respecto al control y la fase salivar, siendo más pronunciada en el grupo que no ha sido cocinado. A pesar de que la degradación de la MC-LR bajo las condiciones gástricas ha sido demostrada por otros autores debido a la acción de la pepsina en el medio ácido ([Moreno et al., 2004](#); [Freitas et al., 2014](#)) puede que en el caso del grupo cocinado la matriz haya sufrido transformaciones químicas durante el cocinado (como desnaturalización de proteínas) y ya no sea tan susceptible a la degradación por las enzimas y, de esta forma, proteja a las MCs. Por otro lado, también hay estudios que contradicen la degradación de MC-LR por parte de la pepsina en condiciones ácidas ([Smith et al., 2010](#)).

De la misma manera, la MC-LR y RR muestran disminuciones significativas de sus contenidos en la fase duodenal con respecto al control y a las fases salivar y gástrica. Hay estudios contradictorios sobre los efectos de las enzimas pancreáticas presentes

en la fase duodenal sobre la MC-LR. La degradación de MC-LR libre por las enzimas tripsina y quimotripsina ha sido señalada como la causa de la reducción de la bioaccesibilidad en mejillones (Freitas et al., 2014). Al ser las MCs unas moléculas de naturaleza peptídica, cabe la posibilidad de que sean degradadas por enzimas proteolíticas. Por otro lado, una resistencia a la degradación enzimática ha sido reportada por otros autores (Moreno et al., 2004; Smith et al., 2010). Esta contracción puede explicarse por las condiciones del experimento, estos autores solo usan soluciones de toxina pura por lo que no tienen en cuenta la unión de la MC-LR a la matriz del mejillón. Además de la unión a proteínas y a otras macromoléculas es posible que durante la lisis por acción de las enzimas pancreáticas se libere de las células del mejillón glutatión (GSH), que es la principal molécula de detoxificación de la MC-LR, uniéndose a ella por medio de la glutatión-S-transferasa (GST).

La fermentación que producen las bacterias de la fase colónica induce una bajada de la bioaccesibilidad de las MCs, exceptuando el caso de la MC-RR, y siendo esta significativa con respecto a la fase gástrica en el caso de la MC-LR, por lo que se sugiere que la flora microbiana tiene un papel protector frente a la intoxicación con cianotoxinas. Manubolu et al. (2014) en sus estudios describió que tras 3 horas de incubación de una solución de toxinas disueltas en agua junto con bacterias de la flora intestinal, se redujeron todas las concentraciones de cianotoxinas hasta aproximadamente solo quedar un 10% de cada una.

5.3 BIOACCESIBILIDAD DE CYN

En los resultados obtenidos de CYN, se han expresado ambos controles (cocinado y sin cocinar) con un valor del 100% a pesar de que el control cocinado ha sufrido una pérdida del 6,78% con respecto al sin cocinar, para poder comprobar así la disminución real tras la bioaccesibilidad con respecto al control cocinado. Tras la digestión de los mejillones se muestra una bajada significativa de la bioaccesibilidad a lo largo del proceso de digestión *in vitro*, sobre todo en las muestras cocinadas, mostrando unos valores de bioaccesibilidad en la fase salivar de $100 \pm 5,79\%$ (sin cocinar) y $54,51 \pm$

2,97% (cocinado) y pasando a $31,96 \pm 6,11\%$ (sin cocinar) y $26,46 \pm 5,05\%$ (cocinado) en la fase colónica (Figura 12).

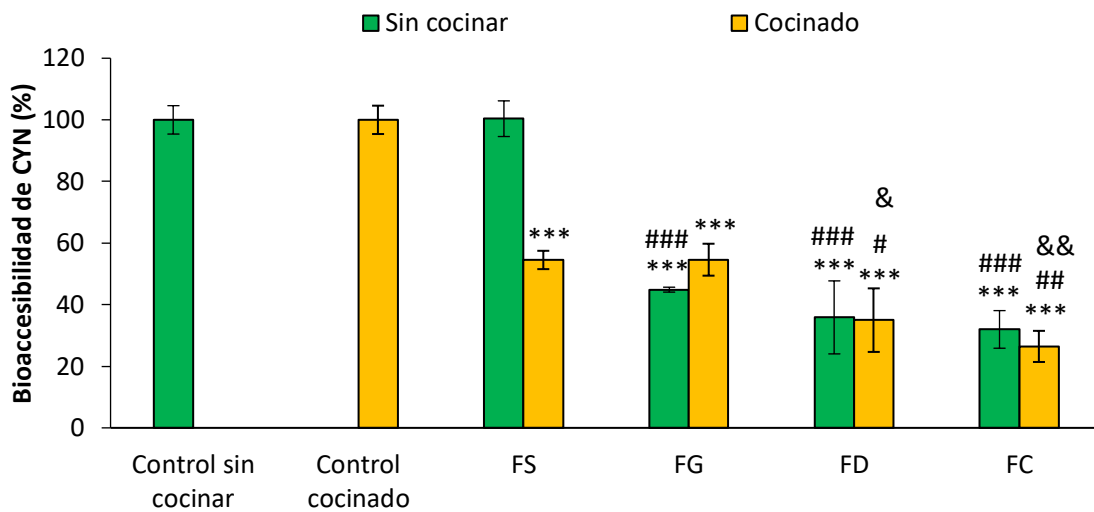


Fig 12. Porcentaje de bioaccesibilidad de CYN en los controles y las diferentes fases digestivas en función de su respectivo grupo control (sin cocinar o cocinado). *** ($p < 0,001$) diferencias estadísticamente significativas comparando con su respectivo control; ### ($p < 0,001$), ## ($p < 0,01$), # ($p < 0,05$) diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase salivar; && ($p < 0,01$), & ($p < 0,05$) diferencias estadísticamente significativas comparando con la fase gástrica. FS: fase salivar; FG: fase gástrica; FD: fase duodenal; FC: fase colónica.

Las variaciones que se obtienen entre los controles y la fase salivar sin cocinar son mínimas, a diferencia de lo que se muestra en el caso del grupo cocinado, ya que como se ha comentado anteriormente, es probable que durante el cocinado se produzcan transformaciones químicas y dé lugar a una mayor facilidad de la CYN para unirse a la matriz. Al pasar por la fase gástrica y duodenal se muestran unas notables bajadas de la bioaccesibilidad en ambos grupos (cocinado y sin cocinar) de acuerdo con los estudios de Freitas et al. (2016), en los que se describe una degradación total de CYN en mejillones en la fase duodenal, lo que hace pensar que la toxina puede unirse a las enzimas digestivas y que por tanto no es detectada por el método empleado. Por otro lado, algunos autores han demostrado la degradación de algunos

alcaloides provenientes de plantas por parte de enzimas digestivas (α -amilasa fúngica y α -quimotripsina bovina) (Zsila et al., 2011; Tintu et al., 2012) por lo que al ser CYN un alcaloide también cabe la posibilidad de que sea degradada por las enzimas de la fase gástrica y duodenal. Además, también ha sido descrita una reducción de CYN debida al pH neutro (Adamski et al., 2016), condiciones similares a las que se encuentra la toxina en la fase duodenal ($6,5 \pm 0,3$).

Los valores más bajos de bioaccesibilidad se observan en la fracción colónica debido en gran parte a la acción de las bacterias ácido-lácticas (BAL) reconocidas como “Generally Regarded as Safe” de acuerdo con la FDA (Food and Drugs Administration) de los EEUU. La actividad de estas bacterias ha sido descrita para múltiples aplicaciones, de entre las cuales destacan su capacidad para eliminar contaminantes tóxicos de los alimentos y el agua (Halttunen et al., 2007). Esta bajada que se produce al exponerse a las BAL no solo ocurre con la CYN, sino también para MCs (MC-LR, -RR e -YR) y Nodularinas (Manubolu et al., 2014). Por lo que, una vez más, esto sugiere que la flora microbiana del intestino tal vez pueda tener una acción protectora sobre la intoxicación con cianotoxinas, como se ha mencionado anteriormente.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Maisanaba et al. (2017, 2018), en los que tanto en el pescado como en los vegetales aparece una gran bajada de la concentración de toxinas tras exposición a las BAL, llegando en el caso del pescado a un 48,9% de bioaccesibilidad y en el caso de la lechuga a un 12,3%. El pescado tiene una proporción proteínas/grasa mayor que los mejillones (Base de Datos Española de Composición de Alimentos, disponible en <http://www.bedca.net/>) por lo que es de esperar que la unión a proteínas sea también mayor, quedando de esta manera la toxina más protegida de las enzimas que pueden degradarla. Por el contrario, los vegetales, como la lechuga, tienen escasa proporción de proteínas por lo que la toxina no puede unirse a ellas, quedando más expuesta a las enzimas. Esto podría explicar por qué los porcentajes de bioaccesibilidad del presente estudio en la fase colónica (32 y 26% en mejillones sin cocinar y cocinados, respectivamente) se encuentran entre los obtenidos en esos estudios para pescado y vegetales.

Estudios previos de toxicidad vía oral de CYN *in vivo* muestran una DL50 entre 10 y 25 veces mayor en comparación con la vía parenteral (Seawright et al., 1999; Falconer et al., 1999). Estas diferencias en función de la vía de administración pueden explicarse por la diferente bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Como se ha podido comprobar en el presente estudio, la bioaccesibilidad de CYN es menor del 100%, lo que indica que la exposición a ella por vía oral es menor que la esperada, en comparación con los resultados que mostrarían el análisis de comida sin digerir.

5.4 AGUAS DE COCINADO

Durante el proceso de cocinado se produce una pérdida de toxina, al ser el método utilizado el cocinado al vapor, cabe la posibilidad de que el vapor condense en la superficie del mejillón y las gotas arrastren parte de la toxina hacia el agua de cocinado, como puede observarse en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de toxinas en las aguas de cocinado.

TOXINA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)
CYN	2,26
MC-LR	1,37
MC-RR	3,96
MC-YR	2,30

Estos resultados concuerdan con la transferencia de toxinas al agua tras el cocinado con hervido y vapor de pescado o vegetales contaminados con ellas (Guzmán-Guillén et al., 2011; Maisanaba et al., 2017, 2018).

6. CONCLUSIONES

Tras realizar la digestión *in vitro* de muestras de mejillones intoxicados con cianotoxinas se puede concluir que:

1. A las concentraciones ensayadas, el paso de las toxinas puras por las fases digestivas (salivar, gástrica, duodenal y colónica) parecen ser eficaces en la reducción de la bioaccesibilidad de las cianotoxinas estudiadas (MC-LR, MC-RR, MC-YR y CYN), llegando a reducciones que varían entre 20-41%.
2. La digestión *in vitro* de mejillones contaminados con cianotoxinas produjo una disminución de la bioaccesibilidad de las mismas a lo largo de las fases digestivas, alcanzando valores en el grupo sin cocinar de 20,94% y de 21,98% en el grupo cocinado, y viéndose más afectadas las MCs que CYN, en el siguiente orden de mayor a menor descenso en su bioaccesibilidad en ambos grupos: MC-LR > MC-YR > CYN > MC-RR.
3. Parece haber cierto sinergismo cuando se lleva a cabo el cocinado y la digestión del alimento.
4. La bioaccesibilidad de CYN en combinación con las MCs aumenta al compararse con resultados de bioaccesibilidad de CYN de otros autores; en cambio, la MC-LR disminuye su bioaccesibilidad cuando se combina con CYN.
5. La bioaccesibilidad depende de varios factores, como la matriz o fuente del alimento, su método de preparación y las interacciones que puedan producirse entre matriz y toxinas.
6. La composición del alimento y su proporción de proteínas/grasa puede provocar variaciones en la bioaccesibilidad.

AGRADECIMIENTOS

No puedo acabar este trabajo sin dedicarles unas palabras a las personas que me han acogido como si fuera uno más de la familia de Toxicología. Empezando por mis tutoras, Ana que me cautivó primero en Seguridad Alimentaria para que después lo hiciera Reme en Toxicología, a la cual tengo que agradecerle el esfuerzo y toda la confianza que ha depositado en mí, espero seguir aprendiendo de ti estos futuros años. A Leti, que ha hecho que eche de menos hasta esas jornadas de 12h en el laboratorio. Y a Eme, que, aunque no me haya enseñado tanta toxicología, me ha enseñado que la paciencia y la perseverancia en el laboratorio son también muy importantes. Muchas gracias de corazón a todas.



Fotos del verano de 2018, en busca del cultivo de cianobacterias más grande.

BIBLIOGRAFÍA

Adamski M, Zmudzki P, Chrapusta E, Bober B, Kaminski A, Zabaglo K, et al. Effect of pH and temperature on the stability of cylindrospermopsin. Characterization of decomposition products. *Algal Res.* 20016; 15: 129–134.

Akcaalan R, Köker L, Oğuz A, Spoo L, Meriluoto J, Albay M. First Report of Cylindrospermopsin Production by Two Cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysochloris ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey. *Toxins.* 2014; 6: 3173–86.

Bazin E, Mourtl A, Humpage R. A, Fessard V. *In Vitro* Evaluation of the Genotoxicity of Acetamiprid. *Environ Mol Mutagen.* 2007; 490: 483–90.

Bedca. Base de Datos Española de Composición de Alimentos [en línea]. [Consultado en Junio 2019]. Disponible en <http://www.bedca.net/>.

Bordin K, Saladino F, Fernández-Blanco C, Meca G, Ruiz MJ, Fernández-Franzón M, et al. Reaction of zearalenone and α -zearalenol with allyl isothiocyanate, characterization of reaction products, their bioaccessibility and bioavailability *in vitro*. *Food Chem.* 2016; 217: 648–54.

Bourke ATC, Hawes RB, Neilson A, Stallman ND. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon.* 1983; 21: 45–8.

Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol.* 2017; 91: 049–130.

Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *J Appl Microbiol.* 1992; 72: 445–59.

Cartmell C, Evans DM, Elwood JML, Fituri HS, Murphy PJ, Caspari T, et al. Synthetic analogues of cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and their toxicological activity. *Toxicol in Vitro.* 2017; 44: 172–81.

Chen L, Chen J, Zhang X, Xie P. A Review of Reproductive Toxicity of Microcystins. *J Hazard Mater.* 2015; 3001: 381-399.

Chong MWK, Wong BSF, Lam PKS, Shaw GR, Seawright AA. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicol.* 2002; 40: 205–11.

Corbel S, Mougin C, Bouaïcha N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere.* 2014; 96: 1–15.

Díez-Quijada L, Prieto AI, Guzmán-Guillén R, Jos A, Cameán AM. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food Chem Toxicol.* 2019; 125: 106–32.

Dodds WK, Perkin JS, Gerken JE. Human Impact on Freshwater Ecosystem Services: A Global Perspective. *Environ Sci Technol.* 2013; 47: 9061–9068.

Elise MJ, Carmichael WW, Denise MC, Susan TC, Christianne EM, Bernadete CA, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins. *N Engl J Med.* 1998; 338 (13): 873–8.

Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer, G.J., Hawkins, P.R. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ Toxicol.* 1999; 14: 143–150.

Falconer IR, Humpage AR. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. *Environ Toxicol.* 2009; 24: 296–303..

Freitas M, Azevedo J, Carvalho AP, Campos A, Vasconcelos V. Effects of storage, processing and proteolytic digestion on microcystin-LR concentration in edible clams. *Food Chem Toxicol.* 2014; 66: 217–23.

Freitas M, Azevedo J, Carvalho AP, Mendes VM, Manadas B, Campos A, et al.

Bioaccessibility and changes on cylindrospermopsin concentration in edible mussels with storage and processing time. *Food Control*. 2016; 59: 567–74.

Griffiths DJ, Saker ML. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol*. 2003; 18: 78–93.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Moreno I, Soria ME, Cameán AM. Effects of thermal treatments during cooking, microwave oven and boiling, on the unconjugated microcystin concentration in muscle of fish (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem Toxicol*. 2011; 49: 2060–7.

Guzmán-Guillén R, Moreno I, Vasconcelos VM, Ríos V, Cameán AM, Prieto AI. Effects of depuration on oxidative biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after subchronic exposure to cyanobacterium producing cylindrospermopsin. *Aquat Toxicol*. 2014; 149: 40–9.

Guzmán-Guillén R, Manzano IL, Moreno IM, Ortega AIP, Moyano R, Blanco A, et al. Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. *Aquat Toxicol*. 2015; 161: 17–24.

Halttunen, T., Salminen, S., Tahvonen, R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2007; 114: 30–35.

Hinojosa MG, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D, Moreno FJ, Cameán AM, Jos A. Neurotoxic assessment of Microcystin-LR, Cylindrospermopsin and their combination on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere*. 2019; 224: 751-764.

Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16: 471–83.

Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol*. 2003; 18: 94–103.

Meriluoto J, Spoof L, Codd GA. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. 1^o ed. John Wiley & Sons; 2017.

JRC Publications Repository. [en línea]. [Consultado en Junio 2019]. Disponible en <http://publications.jrc.ec.europa.eu>

Mackintoshl C, Klumpp S, Cohen P, Codd A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. Biomed Div. 1990; 264 (2): 187–92.

Maisanaba S, Guzmán-Guillén R, Valderrama R, Meca G, Font G, Jos Á, et al. Bioaccessibility and decomposition of cylindrospermopsin in vegetables matrices after the application of an *in vitro* digestion model. Food Chem Toxicol. 2018; 120: 164-171.

Maisanaba S, Saladino F, Font G, Jos Á, Cameán AM, Meca G. Bioaccessibility of Cylindrospermopsin from cooked fish muscle after the application of an *in vitro* digestion model and its bioavailability. Food Chem Toxicol. 2017; 110: 360-370.

Manubolu, M., Madawala, S.R.P., Dutta, P.C., Malmlof, K. *In vitro* biodegradation of cyanotoxins in the rumen fluid of cattle. BMC Vet Res. 2014; 10: 110–117.

Minasyan A, Christophoridis C, Wilson AE, Zervou SK, Kaloudis T, Hiskia A. Diversity of cyanobacteria and the presence of cyanotoxins in the epilimnion of Lake Yerevan (Armenia). Toxicon. 2018; 150: 28–38.

Mishra AK, Tiwari DN, Rai AN. Cyanobacteria From Basic Science to Applications. 1^o ed. Elsevier; 2009.

Moreira C, Vasconcelos V, Antunes A. Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. J Appl Microbiol. 2013; 43: 50–69.

Moreno IM, Maraver J, Agüete EC, Leao M, Gago-Martínez A, Cameán AM. Decomposition of Microcystin-LR, Microcystin-RR, and Microcystin-YR in water

samples submitted to *in Vitro* dissolution tests. J Agric Food Chem. 2004; 52: 5933–5938.

Paerl HW, Hall NS, Calandrino ES. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. Sci Total Environ. 2011; 409: 1739–1745.

Pichardo S, Cameán AM, Jos A. *In vitro* toxicological assessment of cylindrospermopsin: A review. Toxins. 2017; 9: 402.

Puerto M, Maisanaba S, Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Cameán AM, Jos Á, et al. Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindrospermopsin by a battery of *in vitro* tests. Food Chem Toxicol. 2018; 121: 413–22.

Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, Smith MJ. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). Environ Toxicol. 1999; 14: 135–142.

Smith JL, Schulz KL, Zimba PV, Boyer GL. Possible mechanism for the foodweb transfer of covalently bound microcystins. Ecotoxicol Environ Saf. 2010; 73: 757–761.

Svircev Z, Damjana D, Nada T, Biljana M, Geoffrey AC, Jussi M. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. Arch Toxicol. 2017; 91: 621–650.

Tatters AO, Howard MDA, Nagoda C, Busse L, Gellene AG, Caron DA. Multiple stressors at the land-sea interface: Cyanotoxins at the land-sea interface in the Southern California Bight. Toxins. 2017; 9: 95.

Tintu I, Dileep KV, Augustine A, Sadasivan C. An isoquinoline alkaloid, berberine, can inhibit fungal alpha amylase: enzyme kinetic and molecular modeling studies. Chem Biol Drug Des. 2012; 80: 554-560.

Zervou SK, Christophoridis C, Kaloudis T, Triantis TM, Hiskia A. New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. *J Hazard Mater.* 2017; 323: 56–66.

Zsila F, Kámán J, Bogányi B, Józsvai D. Binding of alkaloids into the S1 specificity pocket of α -chymotrypsin: evidence from induced circular dichroism spectra. *Org Biomol Chem.* 2011; 9: 4127-4137.