



FITOVID

JORNADA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS.
CAMPAÑA 2015

Tareas AZTI

Alejandro Barranco, Sandra Rainieri, Nadia Conlledo, Xabier Izquierdo
E-mail: abarranco@azti.es

Arkaute, 6 Abril 2016



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea





1. Objetivos del proyecto

2. Metodología

3. Resultados obtenidos

- Optimización de la metodología.
Acción A3
- Primeros resultados campaña 2015.
Acción B3

4. Conclusiones





Productos fitosanitarios

Empleo de nuevas tecnologías

Eficacia y eficiencia en la
aplicación de fitosanitarios

Fungicidas “residuo cero”

Reducción del número de
tratamientos

Objetivo de AZTI

Evaluación del impacto de los nuevos
tratamientos desde el punto de vista:

- Salud de los consumidores
- Medioambiental



¿Cómo?

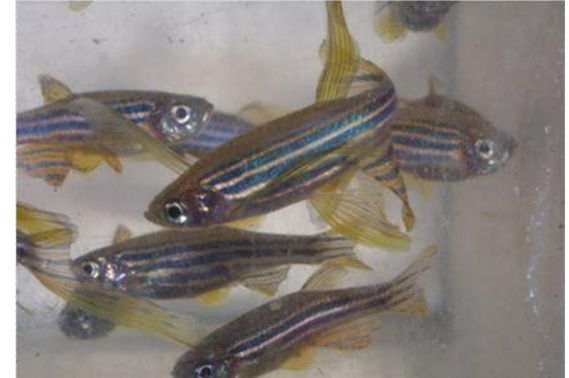
Modelo animal pez cebra

Objetivo principal del proyecto
Reducir el impacto medioambiental en
la producción de uva, mosto y vino



Pez cebra

- Pez asiático de agua dulce ≈ 5 cm
- Crece a lo largo de todo el año.
- Ponen más de 100 huevos que son fertilizados externamente.
- Comparten muchas características con los vertebrados.
- Su genoma ha sido totalmente secuenciado.

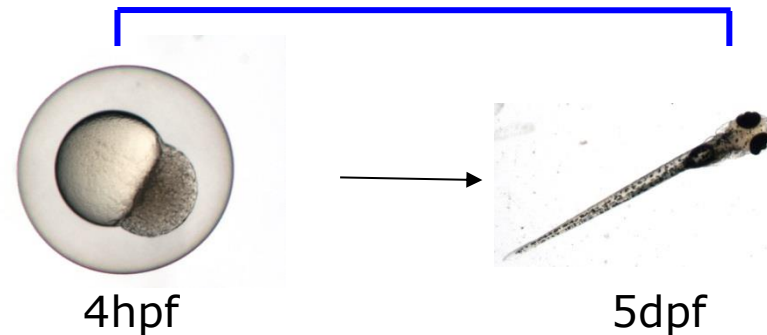


Embriones y larvas

- Son transparentes.
- No son considerados animales de laboratorio.

 Test alternativo

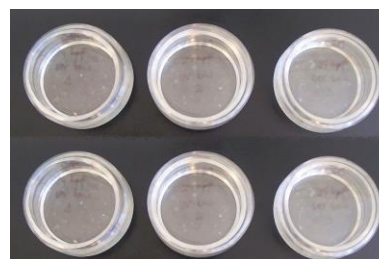
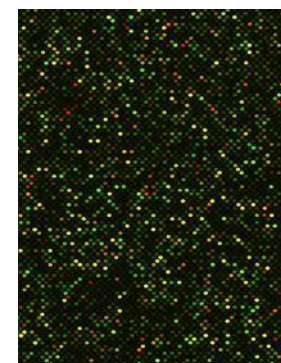
Test alternativo



Directiva Europea 2010/63/UE

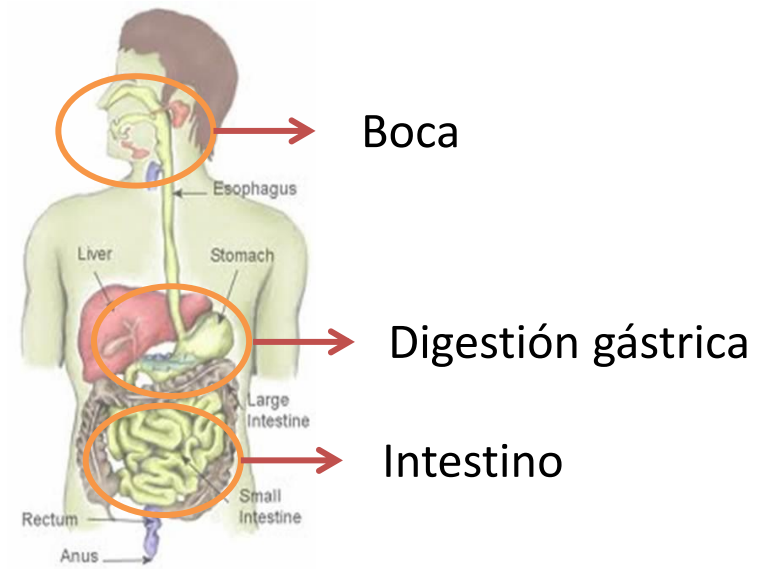
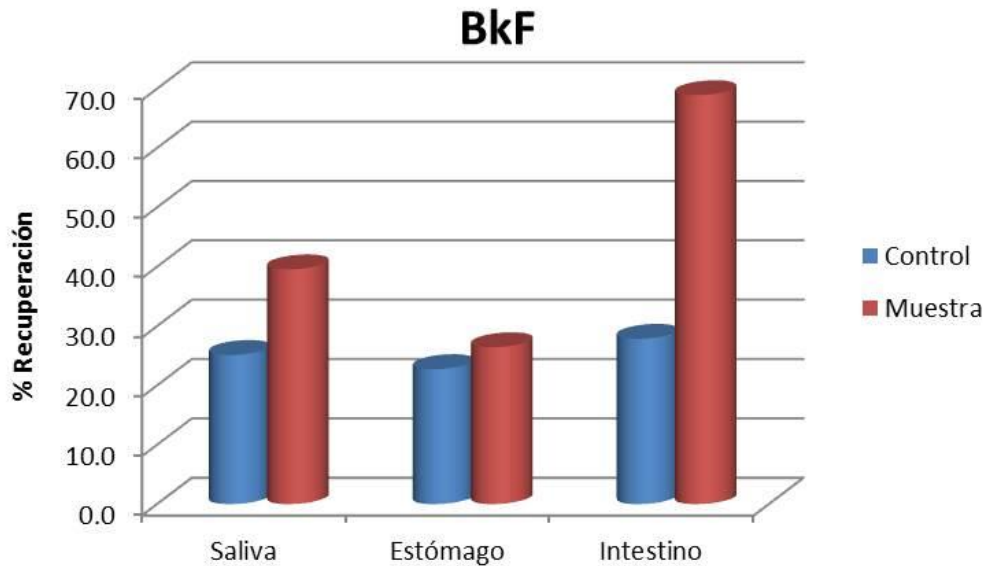


	PARÁMETROS	TÉCNICAS
Morfología	Malformación Pigmentación	Microscopía
Desarrollo	Retrasos Muerte	
Marcadores moleculares	Expresión diferencial de genes marcadores de toxicidad	qRT-PCR
Marcadores químicos	Concentración de las sustancias activas en el medio de exposición y en las larvas Metabolitos	HPLC/GC



Bioaccesibilidad

Fracción soluble después de la digestión de los alimentos que puede ser absorbida en el intestino





Evaluación del impacto sobre el medioambiente y la salud de los consumidores

Acciones preliminares. Acción A3

- Estudio de las propiedades físico-químicas de los principios activos.
- Establecer las condiciones experimentales adecuadas para:
 - La solubilización de los principios activos. Composición del medio de exposición.
 - La estabilización de los principios activos. Estudio del efecto de la luz y la temperatura.



- Estudio con muestras reales (vino, mosto y uva).
 - Optimización del tratamiento de la muestra. Dilución, pre-concentración, fraccionamiento...
- Selección de genes biomarcadores.



Propiedades físico-químicas

Oidio	CL50 (Trucha-96h) mg/L	Solubilidad en agua (mg/L)	Solubilidad en disolventes	Fotodegradación	Hidrólisis en agua (pH7)	Factor de bioconcentración (BCF)
Azufre	>0.063	0.063	Acetona: 480 mg/L Tolueno: 15700 mg/L	0.2	Estable	a)
Penconazol	1.13	73	Soluble	4 días	Estable	320
Tebuconazole	4.4	36	Soluble	Estable	28 días	78
Triadimenol	21,3	50-95	Soluble	9 días	Estable	21
Pyraclostrobin	0.006	1.9	Soluble	1.7 días	Estable	706
Metiram	0.33	2	~100 mg/L	0.3 días	17h	3.2
Metrafenone	>0.82	0.5	Soluble	6.2 días	5 días	530
Boscalid	2.7	4.64	Soluble	30 días	Estable	107
Quinoxifen	0.27	0.05-0.1	Soluble	0.8 días	Estable	5040
Meptyldinocap	0.0569 (Iepomis macrochirus)	0.151-4	Soluble	0.4 días	43 días	992

a) Dato no encontrado



Propiedades físico-químicas

Mildiu	CL50 (Trucha-96h) mg/L	Solubilidad en agua (mg/L)	Solubilidad en disolventes	Fotodegradación	Hidrólisis en agua (pH7)	Factor de bioconcentración (BCF)
Mancozeb	0.074	6.2	Insoluble	Estable	1.3 días	3.2
Folpet	0.23	0.59-0.80	Soluble	Estable	1.2 h	56
Oxicloruro de Cobre	43.8	1.19	Muy poco soluble	Estable	Estable	a)
Cymoxanilo	61	780	Soluble	1.7 días	1.1 días Estable a pH <5	a)
Dimethomorph	3.4	29	Soluble	97 días	70 días	a)
Fosetyl Al	>122	110000	Muy poco	Estable	Estable	a)
Metalaxyl	100	7100	Soluble	Estable	106 días	7
Benalaxyl	24	28.6	Soluble	Estable	365 días	57
Cyazofamid	>100 0.56 (salmonidae)	0.114	Acetona: 41900 Tolueno: 5300	0.1 días	25 días	286
Iprovalicarb	>22.7	17.8	Soluble	Estable	Estable	10

a) Dato no encontrado



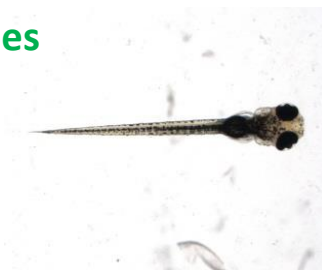
Protocolo ensayo toxicidad en embriones de pez cebra

72 hpf



120 hpf

3/4 concentraciones
fitosanitario



48 h



Composición del medio:

- Embryo water
- 0.5% DMSO
- α -ciclodextrina (para aquellas sustancias que se hidrolizan fácilmente)

Parámetros analizados

- Seguimiento de la concentración en el medio de exposición
- Mortalidad (toxicidad aguda)
- Expresión diferencial de 3 genes seleccionados (toxicidad sub-aguda)

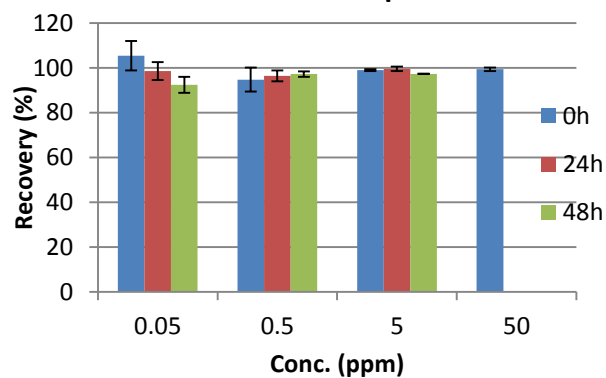


Toxicidad aguda

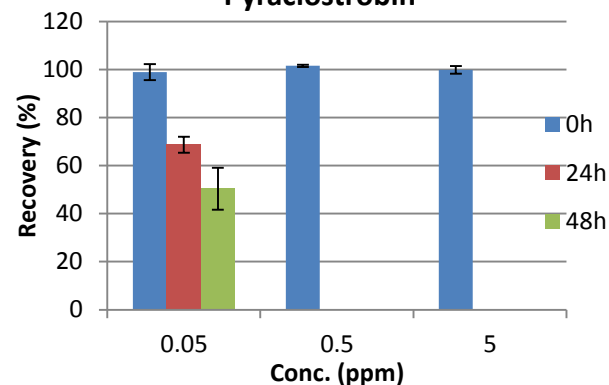
Mildiu

Oídio

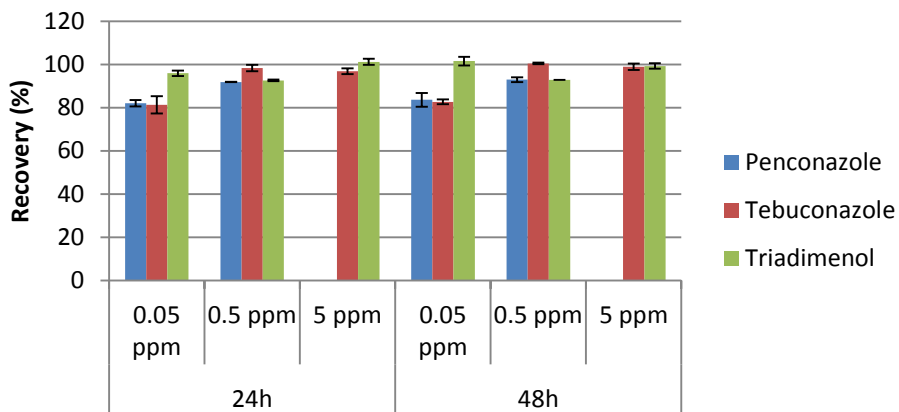
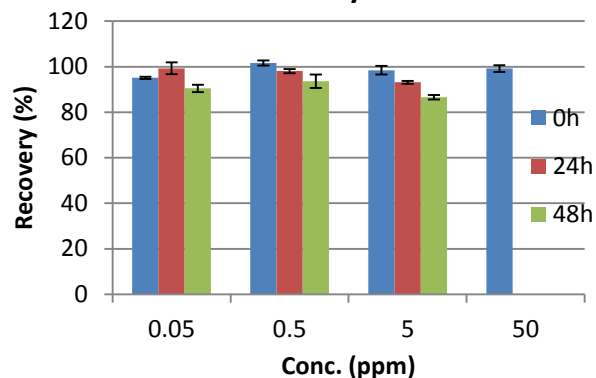
Dimethomorph



Pyraclostrobin



Benalaxyl



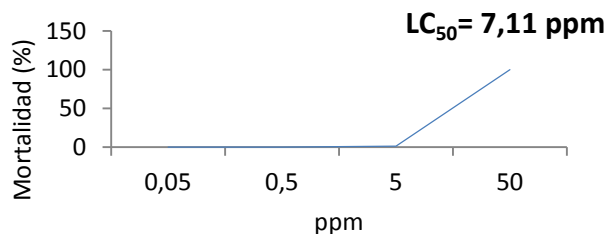


Mildiu

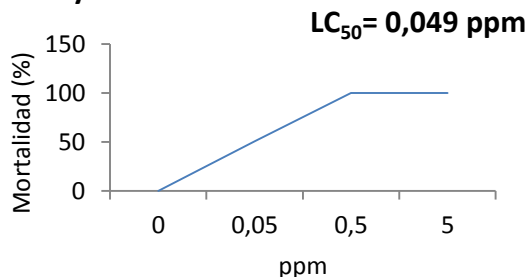
Toxicidad aguda

Oídio

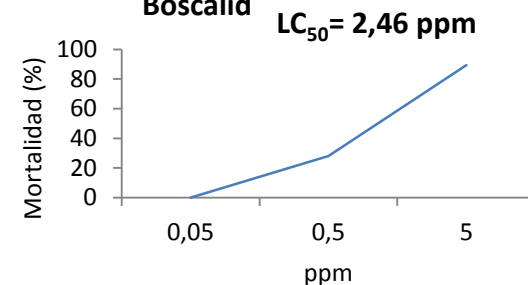
Dimethomorph



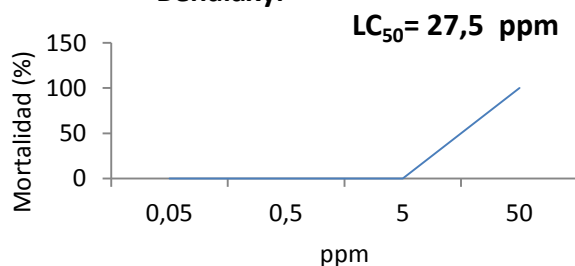
Pyraclostrobin



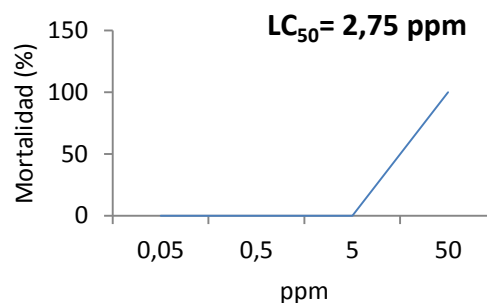
Boscalid



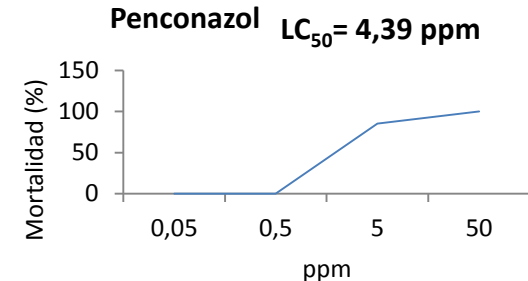
Benalaxyl



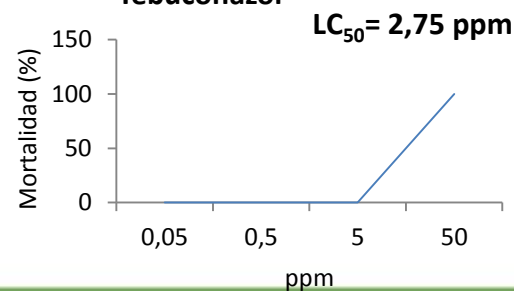
Triadimenol



Penconazol



Tebuconazol





Toxicidad aguda fitosanitarios utilizados en este proyecto

DOWNY MILDEW (Mildiu)	LC₅₀ (ppm) Zebrafish	POWDERY MILDEW (Óídio)	LC₅₀ (ppm) Zebrafish
Mancozeb	0.95*	Meptyldinocap	0.016
Folpet	1.290**	Pyraclostrobin	0,049
Cupper oxychloride	1.19***	Quinoxifen	>1
Cyazofamid	5,19	Boscalid	2,46
Dimethomorph	7,11	Tebuconazol	2,75
Benalaxyl	27,5	Triadimenol	2,75
Fosetyl Al	47,39	Metraphenon	4,72
Metalaxyl	>50	Penconazole	4,39
Cymoxanil	>50		
Iprovalicarb	>50		

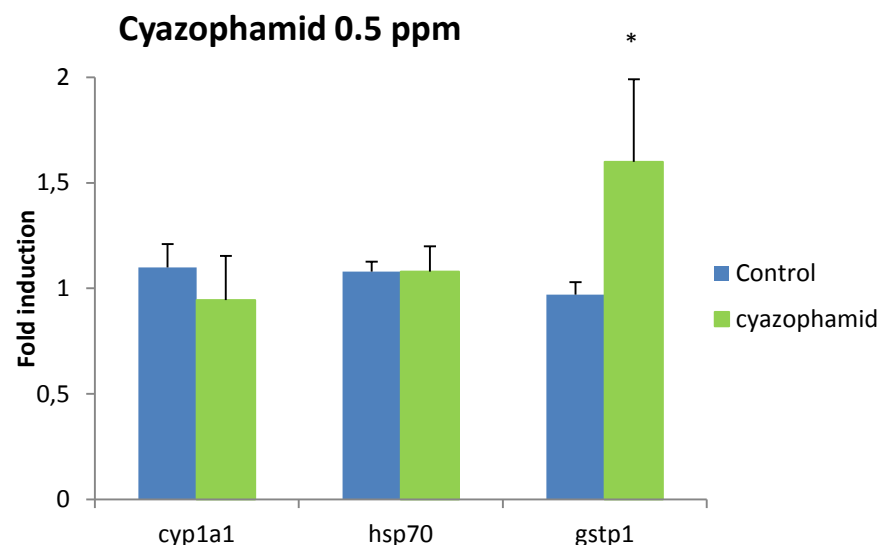
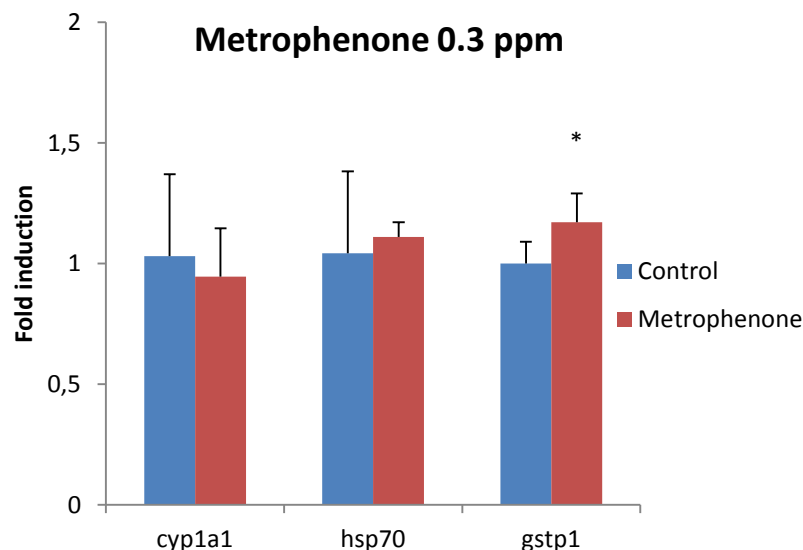
*SANCO/4058/2001 - rev. 4.3

**On adult fish (Cyrino de Oliveira-Filho et al., 2004)

***At 96h exposure (http://www.ctb.agro.nl/ctb_files/140801_14507.PDF)



Toxicidad sub-aguda (a nivel molecular): expresión diferencial de 3 genes biomarcadores toxicidad en ejemplo de fitosanitario para mildiu y oídio



Posibles genes adicionales:

- *vtg1* (vitellogenina) - desarrollo;
- *p53* - apoptosis/ciclo celular;
- *Il1 β* (intrleukina 1 β) - sistema inmune.
- *hhex* (hematopoietically expressed homeobox) – desarrollo y marker receptor endocrino



Método para testar muestras reales: uva, mosto y vino



Vino y mosto

- Ajustar a pH 7
- Extracción líquido-líquido
- Evaporación del disolvente
- Reconstituir en embryo water

Uva

- 1ª extracción con embryowater
- 2ª extracción con metanol
- Evaporación del disolvente
- Reconstituir en embryowater



- El extracto también genera un efecto sobre las larvas. Necesidad de hacer una dilución
- Las muestras de Aia y Laguardia se han comportado de manera diferente



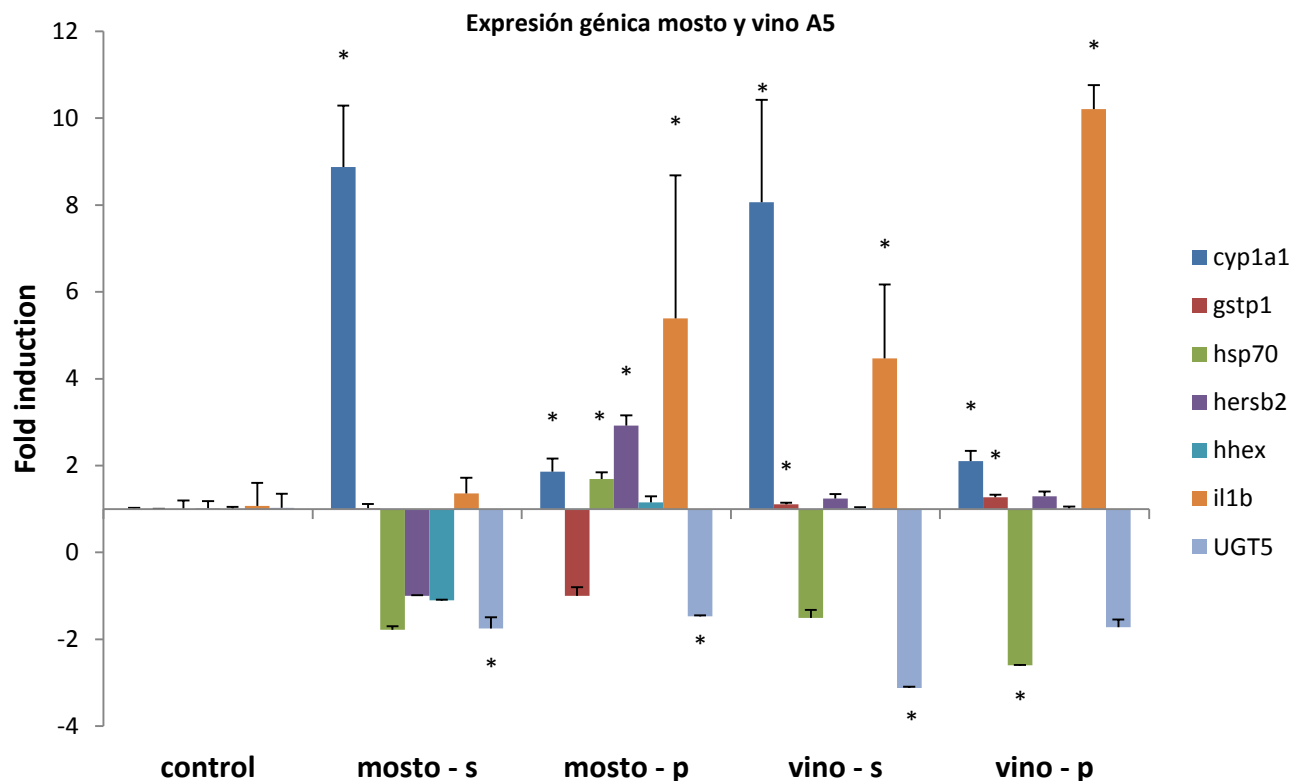
Toxicidad y bioaccesibilidad durante la implementación de las diferentes estrategias

- Aplicación de las metodologías optimizadas a las muestras obtenidas durante la implementación de las diferentes estrategias
 - Principios activos empleados.
 - Mezclas (producto fitosanitario empleado).
 - Extractos de muestras reales.

Se han obtenido extractos de :

- Aia: Vino, mosto y uva. (Completado)
- Laguardia: Vino, mosto y uva. (Completado)

Se ha comenzado con las exposiciones de los extractos a las larvas de pez cebra



- En Aia durante los meses de Julio-Agosto se aplicaron fitosanitarios convencionales en todas las parcelas
- Ausencia de una parcela “control”



Toxicidad y bioaccesibilidad durante la implementación de las diferentes estrategias

- Estudio de la **bioaccesibilidad** de las sustancias activas en las muestras obtenidas durante la implementación de las diferentes estrategias.
 - Aplicación de protocolo de digestión *in vitro*.
 - Cálculo de la fracción accesible.
 - Aparición de metabolitos.
- Una vez conocidas las concentraciones encontradas en uva, mosto y vino, se comenzarán con los estudios de bioaccesibilidad.
- En aquellas muestras donde no se hayan encontrado residuos el estudio se llevará a cabo con muestras dopadas.



- Se han optimizado todos los protocolos de trabajo.
- Gracias a los protocolos de trabajo desarrollados es posible evaluar las muestras de uva, mosto y vino con el pez cebra.
- Ya están disponibles todos los extractos de la campaña 2015.
- Se ha comenzado con la evaluación de la toxicidad. Se han identificado genes marcadores para poder comparar diferentes tratamientos.
- Los estudios de bioaccesibilidad comenzarán ahora.
- Para el verano ya estarán los resultados completos de esta campaña.



La presencia de metabolitos o productos de degradación también puede generar un efecto y, por tanto, hay que considerarlos a la hora de hacer una evaluación del riesgo.

Muchos productos fitosanitarios se aplican como mezclas de diferentes sustancias activas. Los efectos observados pueden variar en función de la composición de la mezcla.

La matriz (alimento) también puede afectar a los efectos causados por las sustancias activas. Es necesario evaluar las muestras reales, no únicamente las sustancias activas solas.



Muchas gracias por su atención



www.azti.es | www.alimentatec.com | www.itsasnet.com

T. +34 94 657 40 00

Txatxarramendi ugarte z/g
48395 Sukarrieta, Bizkaia

Herrera Kaia, Portualdea z/g
20110 Pasaia, Gipuzkoa

Astondo Bidea, Edificio 609
Parque Tecnológico de Bizkaia
48160 Derio, Bizkaia



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

