

Food Safety:

Study about the toxicity of the cultivated bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns, 1843).

José Luis Ochoa*, Érick J. Núñez-Vázquez*, Armando García Ortega**, Isabel Abdo de la Parra**

In his work *Historia de la Antigua Baja California* [1789] (cap. XXIX “Viajes infructuosos del Padre Juan Ugarte y del Hermano Bravo”), Jesuit Francisco Xavier Clavijero described one of the first documented cases of poisoning due to the consumption of puffer fish in Mexico.

Based on this history, deductions can be made regarding the knowledge of ancient Californians regarding its use as food and the danger in eating it due to the toxicity of this type of fish. Consumption of puffer fish dates back to the ancient inhabitants of Central America.

Puffer fish belong to the family *Tetraodontidae* and most of them have the peculiarity that they contain a toxin called tetrodotoxin (TTX), which varies in amount and anatomical distribution among the different species (Núñez-Vázquez et al., 2000).

Human poisoning due to TTX is also known for its abbreviation in English, as PFP = Puffer Fish Poisoning, and its characteristics are: numbness of the tongue, lips, parenthesis of the face and limbs, followed by a sense of lightheadedness and floating, head and stomach ache, nausea, diarrhea and vomit. In severe cases, there is unconsciousness, respiratory paralysis, convulsions and death (Lange, 1990; Yoshikawa-Ebesu et al., 2000; Noguchi and Yoshikawa-Ebesu, 2001).

Puffer fish are included in the list of edible fish published by

Inocuidad alimentaria:

Estudio acerca de la toxicidad del botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns, 1843), de cultivo.

José Luis Ochoa*, Érick J. Núñez-Vázquez*, Armando García Ortega**, Isabel Abdo de la Parra**

El Jesuita Francisco Xavier Clavijero describió en su obra: *Historia de la Antigua Baja California* [1789] (cap. XXIX “Viajes infructuosos del Padre Juan Ugarte y del Hermano Bravo”), uno de los primeros casos documentados del envenenamiento por consumo de botete en México.

A partir de ese relato se puede deducir el conocimiento que los antiguos californios tenían sobre su uso alimenticio y el peligro que representaba su ingesta debido a la toxicidad de este tipo de peces. El consumo de botetes puede remontarse a los antiguos pobladores de Mesoamérica.

Los botetes pertenecen a la familia *Tetraodontidae* y la mayoría tienen la peculiaridad de contener una toxina llamada tetrodotoxina (TTX), que varía en cantidad y distribución anatómica entre las diferentes especies (Núñez-Vázquez et al., 2000).

El envenenamiento humano por TTX también se conoce por sus siglas en inglés como PFP = *Puffer Fish Poisoning*, y se caracteriza por entumecimiento de la lengua, labios, parestesia en la cara y extremidades, seguida de sensación de ligereza y flotabilidad, dolor de cabeza y estómago, náusea, diarrea y vómito. En casos graves se presenta inconsciencia, parálisis respi-



SAGARPA. Unexplainably, neither SAGARPA nor the Department of health have shown concern for the implied risk in the human consumption of a toxic fish.

It is true that the color, taste and texture of puffer fish fillets render it appetizing and its price exceeds that of beef and poultry meat. With proper handling, the fish can be cut into fillets and eaten without any risks; nonetheless, sufficient information on the different species that are caught in our coasts has not been generated and therefore, it is not surprising that let alone in Southern Baja California 16 deaths have been registered due to poisoning by the consumption of puffer fish in the last 28 years (Nuñez-Vázquez et al., 2000). Despite this, its consumption is not deemed a public health problem.

Pursuant to the literature, other cultivated species of puffer fish are practically safe (Lin et al., 1998; Matsui et al., 1982); therefore, it is convenient to confirm if this is the case for the bullseye puffer in our country (Abdo de la Parra and Duncan, 2002).

For such purpose, sperm, roe, embryo, larvae, postlarvae, juveniles and adults grown in the CIAD facilities were collected. The mouse bio-assay used to detect TTX and its analogous toxins was performed pursuant to recommendations of the AOAC (1995), and the different tissues were homogenized adjusting the pH with 0.1 N HCl (or in a 1:1 weight-volume ratio), taken to a boil for 5 minutes and centrifuging it at 1,100 xg for 5 min. The supernatant (1 ml), was injected intraperitoneally into 3 white mice of the CD-1 strain, with a weight between 18-23 g (obtained from the CIBNOR

ratoria, convulsiones y muerte (Lange, 1990; Yoshikawa-Ebesu et al., 2000; Noguchi y Yoshikawa-Ebesu, 2001).

El botete está incluido en la lista de peces comestibles publicada por SAGARPA. Inexplicablemente, ni la SAGARPA ni la Secretaria de Salud se han mostrado preocupadas por el riesgo implícito en el consumo de un pez que es tóxico.

Es cierto, el color, sabor y textura del filete de botete lo hacen apetitoso y alcanza precios superiores a la carne de res o pollo. Con un adecuado manejo, el pez puede ser fileteado y consumido sin riesgo; sin embargo, no se ha generado información suficiente sobre las diferentes especies que son capturadas en nuestros litorales y, por tanto, no sorprende que tan sólo en Baja California Sur se hayan registrado 16 decesos por intoxicación al consumir botete en los últimos 28 años (Nuñez-Vázquez et al., 2000). Pese a ello, su consumo no se considera un problema de salud pública.

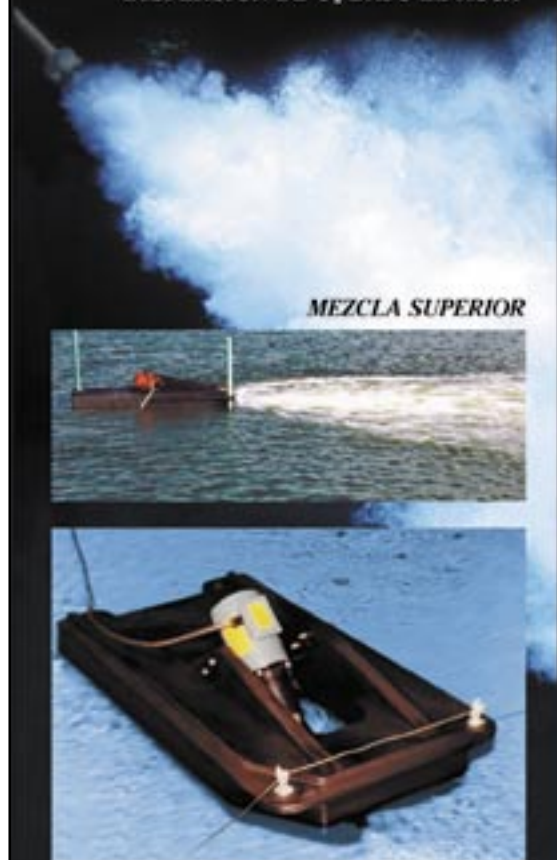
Conforme a la literatura, otras especies de botete cultivadas son prácticamente inocuas (Lin et al., 1998; Matsui et al., 1982), por lo que resulta conveniente confirmar si éste es también el caso con el botete "diana" en nuestro país (Abdo de la Parra y Duncan, 2002).

Para ello, se colectaron esperma, huevos, embriones, larvas, post-larvas, juveniles y adultos cultivados en las instalaciones del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo). El bioensayo de ratón utilizado para detectar la TTX y sus análogos se realizó conforme a las recomendaciones de la AOAC (Association of Analytical Communities) (1995), y los diferentes tejidos se homogenizaron ajustando el pH con 0.1 N de HCl (o en relación 1:1 peso-volumen), llevando a ebullición durante 5 min y centrifugando a 1,100 xg durante 5 min. El sobrenadante (1 ml), se inyectó intraperitonealmente a 3 ratones albinos cepa CD-1 de un peso entre

¡Máxima Aireación!

Muchas especies acuícolas habitan en los fondos. El aireador AIRE-O₂® libera una fina burbuja que incrementa los niveles de oxígeno disuelto (O.D.) y lo circula hacia abajo donde se encuentra el pez y el camarón. ¡Ventaja que los otros sistemas no tienen!

DISPERSIÓN DE O₂ BAJO EL AGUA



MEZCLA SUPERIOR

- Maximice su Producción
- Liviano y Portátil
- Ideal Para Sistemas de Cero Recambio
- Económico & Mínimo Mantenimiento

Pregúntele a los expertos en aireación acerca del Original Aireador AIRE-O₂® (Desde 1974)



Aeration Industries®

AIRE-O₂®

4100 Peavey Road • Chaska, MN 55318-2353 USA
1-952-448-6789 / 1-800-328-8287 (USA)
FAX 1-952-448-7293 • acua@aireo2.com

www.aireo2.com

©2005 Aeration Industries Intl., Inc. All Rights Reserved.

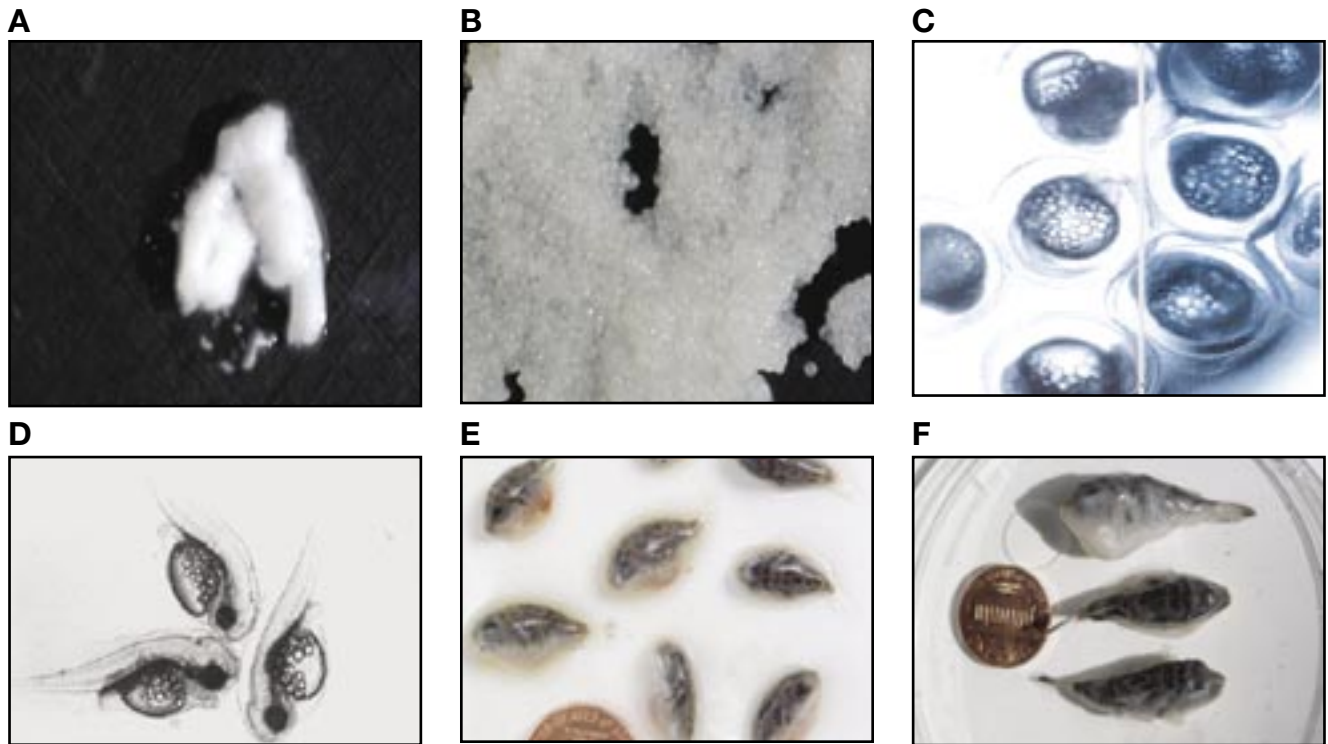


Fig. 1. Samples of a cultivated bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) analyzed to determine the content of TTX. A) Sperm; B) Roe; C) Embryo; D) Larvae; E) Post-larvae; F) Juveniles; G) Adults.

Fig. 1. Muestras de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) de cultivo analizadas para determinar el contenido de TTX. A) Esperma; B) Hueva; C) Embriones; D) Larvas; E) Post-larvas; F) Juveniles; G) Adultos.

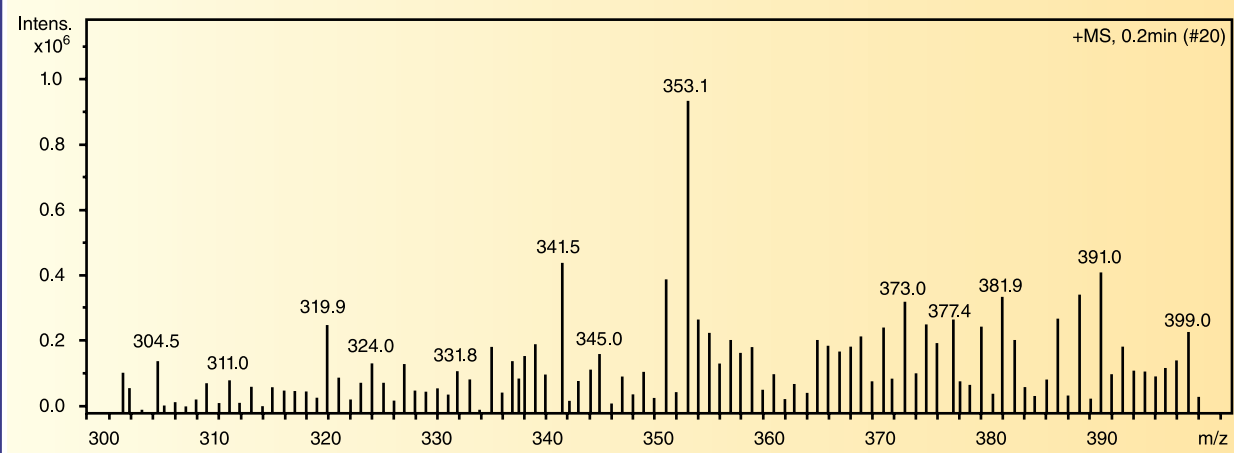
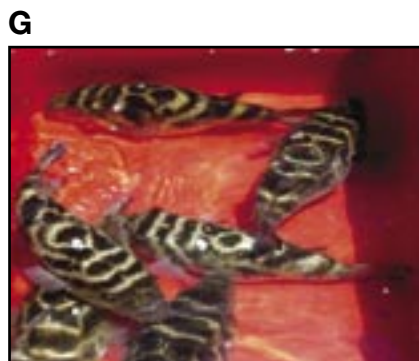


Fig. 2. MS-ESI Analysis of adult bullseye puffer fish (A) (muscle) and (C) adult (Viscera).

Fig. 2. Análisis MS-ESI de botete diana (A) adulto (músculo) y (C) Adulto (Viscera).

biotarium), to observe the clinical symptoms and survival period.

The concentration of TTX in mice units, UR, was defined as the toxin concentration capable of killing a mouse with a weight of 18-23 g, in a 7-15 min time frame, which is equal to 0.22 µg de TTX.

The bioassay was compared to a standard TTX (Sigma Chemical Co. USA) assay. The following equation

was used to calculate the sample's toxin concentration: $\mu\text{gVPM}/100 \text{ g}$ of tissue = $\text{media URC}/\text{ml} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200$; where VPM is the amount of paralyzing poison in the tissue; URC are the corrected mouse units (according to the Sommer Table in AOAC, 1995); FC and FD represent predetermined conversion factors; the former of the standard toxin and the latter of the dilution factor.

As a supplement, a qualitative analysis was performed through the direct infusion by mass spectrometry (MS-ESI) following the methodology described by Shoji et al., 2001. For such purpose, each extract was centrifuged at 10,000 xg for 15 min. in a Beckman Etm micro-centrifuge. The obtained supernatant was filte-

18-23 g (obtenidos del Bioterio del CIBNOR –Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste–), para observar los signos clínicos y el tiempo de sobrevivencia.

La concentración de TTX en unidades ratón, UR, se definió como la concentración de toxina capaz de matar a un ratón de 18-23 g de peso en un intervalo de 7-15 min, lo cual es equivalente a 0.22 µg de TTX.

El bioensayo se comparó con un estándar de TTX (Sigma Chemical Co. USA). Para calcular la concentración de toxina en la muestra se utilizó la siguiente ecuación: $\mu\text{gVPM}/100 \text{ g}$ de tejido = $\text{media URC}/\text{ml} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200$; En donde VPM es la cantidad de veneno paralizante en el tejido; URC son las unidades de ratón corregidas (según Tabla de Sommer en AOAC, 1995); FC y FD representan los factores de

Es fácil darse cuenta quién confía en **nicovita**



alicorp

Av. Argentina 4793 Callao - Perú
Telf.: (51-1) 3150800 Telf.: (51-1) 5950844
Fax: (51-1) 3150837
atencionclientes@alicorp.com.pe
www.nicovita.com.pe

nicovita
CAMARON DE MAR
Alimentando su confianza



red through Millipore disks with a 0.22 μ membrane.


A TTX standard (Sigma Chemical Co. USA), as well as each of the extracts, was mixed with ammonium formate (in 40 μl:10μl ratio, respectively) and injected into the mass spectrometer (Agilent Technologies 1100).

Results and Conclusions:

Only the extracts of viscera and muscles of juveniles, as well as the viscera of cultivated adult bullseye puffer fish caused slight clinical symptoms similar to those described for TTX and their analogous toxins in mice (paralysis of the hind legs and brief dyspnea), being more marked for adult viscera.

All mice recovered completely. Consequently, it can be stated that TTX is present in some tissues of cultivated bullseye puffer fish, but in very low concentrations (less than one mouse unit) and that therefore, it does not represent any risk whatsoever to consumers. It is important to mention that the mouse bioassay at levels lower than 1 unit is not reliable and that therefore, its confirmation requires more precise techniques.

The analysis through MS-ESI allowed to verify the presence of TTX (m/z 319.9) in muscle and viscera of juveniles, as well as in the viscera of cultivated adult bullseye puffer fish (Figure 2). At the same time, all other stages and the food supplied (naupli of artemia and microparticulates) did not register the toxin by MS-ESI, thus coinciding with the bioassay conducted with mice.

Therefore, it can be asserted that under the farming program implemented by CIAD, bullseye puffer fish are practically safe, since 900-1000 UR are required to produce the poisoning in a person who weighs 50 kg. It is worthwhile researching if under the strategy applied by the Centro de Desarrollo Tecnológico de Especies Marinas, CEDETEM, in Jalisco, Mexico, cultivated bullseye puffer fish are also safe and thus, be able to support the aquaculture of bullesye puffer fish in Mexico and other countries (Panorama Acuicola, 2005). 

Stage/sample	Amount (weight or No. of organisms); age (months)	Characteristics (Size: cm; Weight: g.)
Sperm	3 g	Obtained from 2 males born at CIAD in 2000
Roe	20 g	Obtained from 1 female born at CIAD in 2000 (24.6 cm & 620 g)
Embryo	10 g & 2 days p. f.	Obtained in June 2004
Larva	2 g & 2 days p. e.	Obtained in June 2004
Post-larva	150 organisms (1.5 moths)	13.2 ± 2.14 mm & 1 ± 0.27g
Juveniles	70 organisms (4 months)	47.16 ± 2.85 mm & 3.29 ± 0.73 g
Adults	6 organisms (1.4 years)	105. 63 ± 8.96 mm & 34.04 ± 3.9 g
*Naupli of artemia	10 g	Obtained in June 2004
*Microparticulate feed	10 g (prepared at CIAD)	Prepared in July 2004

TABLE 1. Characteristics of samples of the different farming stages of *S.annulatus* and supplied feed p. f. Post-fertilization; p. e. Post-eclosion. *Note. Feed supplied for larvae, juveniles and adults.

Estadio/muestra	Cantidad (peso o No. de organismos); edad (meses)	Características (Talla: cm; Peso: g.)
Esperma	3 g	Obtenidos de 2 machos nacidos en el CIAD en el año 2000
Huevo	20 g	Obtenidos de 1 hembra nacida en el CIAD en el año 2000 (24.6 cm y 620 g)
Embriones	10 g y 2 días p. f.	Obtenidos en junio del 2004
Larvas	2 g y 2 días p. e.	Obtenidos en junio del 2004
Post-larvas	150 organismos (1.5 meses)	13.2 ± 2.14 mm & 1 ± 0.27g
Juveniles	70 organismos (4 meses)	47.16 ± 2.85 mm & 3.29 ± 0.73 g
Adultos	6 organismos (1.4 años)	105. 63 ± 8.96 mm & 34.04 ± 3.9 g
*Nauplios de artemia	10 g	Obtenidos en junio del 2004
*Alimento microparticulado	10 g (elaborado en el CIAD)	Elaborado en Julio del 2004

CUADRO 1. Características de las muestras de las distintas etapas del cultivo de *S.annulatus* y del alimento suministrado p. f. Post-fecundación; p. e. Post-eclosión. *Nota. Alimento suministrado para larvas, juveniles y adultos.



*Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo Santa Rita. La Paz, BCS, 23090. jchochoa@cibnor.mx

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD). Av. Sabalo Cerritos s/n, Apdo. Postal 711, C.P. 82010, Mazatlán, Sinaloa. agarcia@victoria.ciad.mx

conversión predeterminados, el primero de la toxina estándar y el segundo del factor de dilución.

Complementariamente se realizó el análisis cualitativo mediante infusión directa por espectrometría de masas (MS-ESI) siguiendo la metodología descrita por Shoji et al., 2001. Para ello cada extracto fue centrifugado a 10,000 xg por 15 min en una microcentrífuga Beckman E™. El sobrenadante obtenido fue filtrado mediante discos millipore con una membrana de 0.22 µ.

Un estándar de TTX (Sigma Chemical Co. USA), al igual que cada uno de los extractos, se mezclaron con formato de amonio (en una relación 40 µl:10µl, respectivamente) e inyectaron al espectrómetro de masas (Agilent Technologies 1100).

Resultados y Conclusiones:

Sólo los extractos de vísceras y músculo de juveniles, así como las vísceras de los adultos de los botetes "diana" de cultivo, provocaron signos clínicos leves semejantes a los descritos para la TTX y sus análogos en ratones (parálisis de los cuartos traseros y



breve disnea), siendo más marcados en las vísceras de los adultos.

Todos los ratones se recuperaron completamente. Consecuentemente, se puede afirmar que la TTX se encuentra presente en algunos tejidos de botete "diana" de cultivo, pero en muy baja concentración (menos de una unidad de ratón), como para representar riesgo alguno a los consumidores. Es importante mencionar que el bioensayo de ratón a niveles inferiores a 1 unidad no es confiable por lo que su confirmación requiere de técnicas más precisas.

El análisis por medio de MS-ESI permitió verificar la presencia de TTX

(m/z 319.9) en los extractos del músculo y vísceras de juveniles, así como en las vísceras de adultos del botete "diana" de cultivo (Figura 2). A su vez, los demás estadios y el alimento suministrado (nauplios de artemia y microparticulado) no se detectó la toxina por MS-ESI coincidiendo con los resultados del bioensayo de ratón.

Por tanto, se puede afirmar que bajo el esquema de cultivo implementado por el CIAD el botete "diana" de cultivo es prácticamente inocuo, ya que se requieren de 900-1000 UR para producir la intoxicación en una persona de 50 Kg de peso. Vale la pena averiguar si bajo la estrategia aplicada por el Centro de Desarrollo Tecnológico de Especies Marinas, CEDETEM, en Jalisco, México, también el botete diana cultivado resulta inocuo y de esta suerte respaldar la acuicultura del botete diana en México y otros países (Panorama Acuícola, 2005). [pam](#)

*Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo Santa Rita. La Paz, BCS, 23090. jochoa@cibnor.mx

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD). Av. Sabalo Cerritos s/n, Apdo. Postal 711, C.P. 82010, Mazatlán, Sinaloa. agarcia@victoria.ciad.mx

www.serviacua.com.mx



Serviacua

AIREACION

CIRCULACION

OXIGENACION

DEPURACION DE MOLUSCOS



ALMACENAJE





NOVATEC

REEF

CREEL PUMP INC.

CULTIVO

