



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Aztarna mailako kutsatzaile
organikoen biokontzentrazioa eta
metabolizazioa arrainetan:
Amitriptilinarekin kasua**

*Haizea Ziarrusta, Ruth Berasategui,
Leire Mijangos, Urtzi Izagirre, Merle
M. Plassmann, Jonathan P. Benskin,
Eneritz Anakabe, Maitane Olivares
eta Olatz Zuloaga*

28-33 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.04>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Aztarna mailako kutsatzaile organikoen biokontzentrazioa eta metabolizazioa arrainetan: Amitriptilinen kasua

Haizea Ziarrusta^{1,2}, Ruth C. Berasategui¹, Leire Mijangos¹, Urtzi Izagirre³, Merle M. Plassmann², Jonathan P. Benskin², Eneritz Anakabe⁴, Maitane Olivares¹ eta Olatz Zuloaga^{1,3}

1. Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria), 2. Department of Environmental Science and Analytical Chemistry (Stockholm University, Stockholm, Suedia), 3. Plentziako Itsas Estazioa (Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Euskal Herria), 4. Kimika Organikoa II Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria)

haizea.ziarrusta@ehu.eus

Laburpena

Gizakiok gure eguneroko bizitzan ehundaka produktu erabiltzen ditugu, besteak beste, zainketa pertsonalerako produktuak eta farmakoak. Produktu horien erabilpena ekosistemen kutsadurarako bide bihurtzen da, eta araztegiak ez direnez gai konposatu hauek guztiz eliminatzeko, gure ibai eta itsasoetara heldu eta bertako sedimentuetan zein biotan metatu eta transformatzeko joera erakusten dute. Zenbait kasutan, 1. eta 2. faseko metabolizazio-prozesuetan lortutako eratorriak, jatorrizko kutsatzailea baino toxikoagoak izan daitezkeela azpimarratu behar da. Lan honetan, depresioaren aurka erabiltzen den amitriptilina farmakoaren biokontzentrazioa eta metabolizazioa aztertu dira urraboru arrainetan (*Sparus aurata*).

Hitz gakoak: aztarna mailako kutsatzaile organikoak, amitriptilina, depresioaren kontrako konposatu triziklikoak, biokontzentrazioa, metabolizazioa, urraboru arraina (*Sparus aurata*)

Abstract

*Humans use thousands of chemical products, including pharmaceutical and personal care products (PPCPs). Due to the incomplete elimination of such chemicals in urban wastewater treatment plants, their use is one of the main pathways for environmental pollution. Once in the rivers and oceans, the above-mentioned compounds tend to accumulate and transform in sediments and biota, and it should be highlighted that in some cases, the phase I and phase II metabolism products are even more toxic than the original pollutant. In this work we have studied the bioconcentration and metabolism of the tricyclic antidepressant amitriptyline in gilt-head bream (*Sparus aurata*).*

*Keywords: trace organic pollutants, amitriptyline, tricyclic antidepressants, bioconcentration, metabolism, gilt-head bream (*Sparus aurata*).*

1. Sarrera eta motibazioa

Garai berriekin lotuta dauden xaboiak, koloniak, kosmetikoak eta farmakoak gizartearen ongizatearen eta garapenaren parte-hartzaile aktiboak badira ere, aldi berean, ingurumeneko poluzioaren eta osasun arazoaren eragileak dira. Hain zuzen ere, produktu horietan dauden konposatu kimikoak ingurumenara heldu eta ura, atmosfera, sedimentuak eta biota kutsatzen baitituzte. Guzti hau dela eta, uraren kutsadura gutxitzea eta kontrolatzea da XXI. mendeko erronka nagusietako bat.

Zainketa pertsonalerako produktu eta farmako askoren osagaien artean konposatu organikoak ditugu, eta azken hauek ez direnez erabat eliminatzen ohiko araztegiarako tratamenduetan, ibaietako zein itsasoetako uretara isurtzen dira. Behin uretara isurita, materia partikulatuari lotu, sedimentatu, transformatu, espezie desberdinetan metatu edota metaboliza daitezke. Garraio, akumulazio eta eraldatze prozesu hauek ekosisteman izan ditzaketen eragin toxikoen ondorioz, konposatu organikoen analisia eta monitorizazioa sustatzen dituzten legediak ezarri dira izaki bizidunen ongizatea eta uraren kalitate egokia bermatzeko. Ildo horretan, azpimarratzekoa da Europako Ur Esparru Zuzentarauak (*Water Framework Directive*, WFD 2013/39/CE) ezarritako araudia. Bertan, lehentasunezko kutsatzaileen uretako eta biotako gehienezko kontzentrazioak zehazteaz gain, konposatu emergenteen

jarraipen zorrotza egitea gomendatzen da, nahiz eta azken hauek oraindik arautu gabe egon. Horien artean farmakoak, disruptore endokrinoak, garbiketa produktuak, nanomaterialak eta konposatu perfluoratuak daude.

Merkatuan gizaki eta animalientzako 5.000 konposatu farmazeutiko baino gehiago daude eskuragarri eta 100.000-200.000 tona sintetizatzen dira urtero (Van Doorlaer et al., 2014). Behin farmakoak kontsumituta, gorputzean metabolizatu eta gernutik kanporatzen dira, eta araztegiatara iristen dira (Baker eta Kasprzyk-Horden, 2013). Baina araztegiek oraindik ez dute farmako guztien ezabatze eraginkorra bermatzen duen sistemarik (Baker eta Kasprzyk-Horden, 2013). Batzuetan, gainera, farmakoetatik eratorriak diren degradazio produktuak eta metabolitoak jatorrizko farmakoa baino kaltegarriagoak izan daitezke (Daghrir eta Drogui, 2013). Ohikoa den arren konposatu hauek kontzentrazio baxuetan aurkitzea (ng/L mailan), ingurumenean modu jarraituan agertzen diren konposatuak direnez, epe laburreko zein luzeko arazoak sor daitezke gizakietan eta ur-espezieetan. Arrainen gisako uretako organismo bizidunak dira konposatu horietara esposatuta egoteko aukera handiena dutenak, eta frogatuta dago zenbait farmakok arrainetan sexu aldaketa, antibiotikoen aurkako babesa edota epe luzeko arazo toxikologikoak sustatu ditzaketela (Marcoux et al., 2013; McEneff et al., 2014). Beraz, nabarmentzekoa da ingurumenean aurkitzen diren konposatu sintetikoen jarraipen osotuaren beharrezana, uretan soilik beharrean, uretako organismo bizidunetan ere bai.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Depresioaren eta buruko gaitzen kontrako farmako erabilienek serotoninaren birkaptazio selektiboa inhibitzen dute (SSRI – *Selective Serotonine Reuptake Inhibitor* delakoak). Egun, efektu sekundario gutxiago dituzten eta selektiboagoak diren fluoxetina bezalako SSRI farmakoak gehiago erabiltzen diren arren, antidepresibo triziklikoak oso erabiliak dira eraginkortasun handia dutelako. Antidepresibo triziklikoen artean gehien erabiltzen diren konposatuak, amitriptilina (AMI), imipramina eta klomipramina (serotoninan eragina dutenak), eta nortriptilina (NOR, norepinefrinan eragina duena) dira.

Antidepresibo triziklikoen ezaugarri fisiko-kimikoak direla eta, organismo bizidunen hainbat ehunetan bioakumulatzeko gaitasuna dute, eta Euskal Herriko ibaietan jasotako arrainen gibelean ere detektatu da amitriptilina (Ziarrusta et al., 2015). Gainera, oraindik arlo honetan ikerketa gutxi egin badira ere, amitriptilina eta antzeko antidepresiboek arrainetan eragin kaltegarriak sortzen dituztela ikusi da, ATP-aren aktibitatea inhibituz (Lajeunesse et al., 2011) edota ugalketa eta garapen sistemak aztoratuz (Yang et al., 2014).

Aurretiaz aipatutako guztia kontuan hartuta, lan honen helburua urraburu arrainetan (*Sparus aurata*) amitriptilinen biokontzentrazioa eta metabolizazioa aztertzea da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Esposizio-esperimentuak eta laginen analisisa

Plentziako Itsas Estazioko akuarioetan esposizio esperimentuak egiteko Urraburu arrain (*Sparus Aurata*) gazteak arrain-haztegitik lortu dira. Arrainen bizi-irautea ziurtatzeko laborategiko tenperatura 18°Ctan mantendu da, 14:10-h argitasun/iluntasun zikloak bermatu dira eta egunero 0,10 g arrinjaki/arrain eman zaie. Esposizio-esperimentuak bi kontzentrazio mailatan egin dira: kontzentrazio altuan (10 ng/mL AMI) eta ingurumenean aurkitzen den kontzentrazio baxuagoan (0,20 ng/mL AMI). Kasu bietan, kontrol gisa, kutsatu gabeko beste edukiontzi bat izan dugu baldintza berdinetan.

Arrainen lagin-biltze eta disezioa Euskal Herriko Unibertsitateko Bioetika Batzordearen jarraibideen arabera egin dira. Kutsatutako zein kontroleko edukiontzitik 10 urraburu jaso dira esposizioa hasi eta bigarren, laugarren eta zazpigarren egunetan. Edukiontzietatik arrainak bildu eta ordu erdira gehienez arrainen disezioa egin da plasma, behazuna eta ehun biologikoak (gibela, garuna, zakatzak eta muskulua) bereizteko, eta laginak -80°Ctan mantendu dira aztertu arte.

Laginketako egunetan, esposatutako uretan amitriptilinarene eta nortriptilinarene kontzentrazioa ezagutzeko, tankeetako ura ere bildu da eta aurretiaz garatutako metodo analitikoa erabiliz aztertu da (Ziarrusta et al., 2015).

Lagin biologikoak aztertu aurretik (Ziarrusta et al., 2015), egun berean jasotako (kontrola eta esposizio 2., 4. eta 7. egunak) 10 arrainen plasma, behazun eta liofilizatutako ehunak elkartu eta homogeneizatu dira, arrainez-arrain eman daitezkeen aldakortasunak ekiditeko.

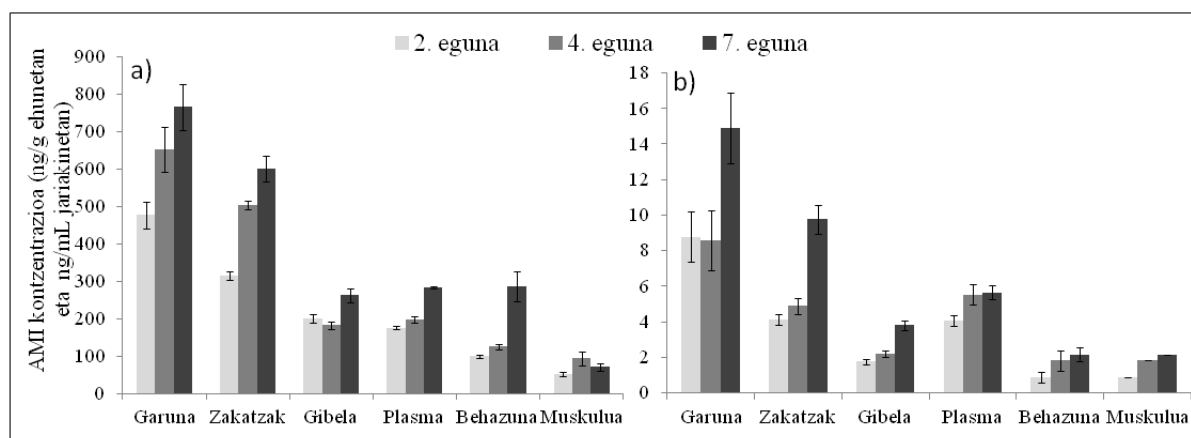
Ur zein lagin biologiko guztien erauziak likido-kromatografia-masa-espektrometriaren bidez analizatu dira. Analisi kuantitatiboa egiteko bereizmen baxuko tandem masa-espektrometria erabili da, hain zuzen ere, Agilent 1260 serieko likido-kromatografoa eta Agilent 6430 kuadropolo hirukoitzeko masa espektrometroa. Analisi kualitatiboa, ordea, bereizmen altuko tandem masa-espektrometriaren bidez aurrera eraman da, Thermo Scientific etxeko Q Exactive HF kuadropolo-Orbitrap masa-espektrometro hibridoari lotutako Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 ultrabereizmeneko likido-kromatografoan.

3.2 Amitriptilinarene akumulazioa urraburu arrainetan

Esperimentu osoan zehar ez da arrainik hil, eta esposatutako eta kontroleko arrainen baldintza-faktorea (arrainaren masa/arrainaren luzera³ x 100) eta indize hepatosomatikoa (gibelaren masa/arrainaren masa osoa x 100) estatistikoki konparagarriak izan dira (p balioa > 0.05). Modu honetan, arrainen bizi-kalitatea esperimentuan zehar egonkor mantendu dela ziurtatu da.

1. Irudian ikus daitekeenez, amitriptilina kontzentrazio altuenak, esposizio 7. egunean, garunean eta zakatzetan aurkitu ziren, ondoren gibelean, plasman, behazunean, eta azkenik, maila baxuago batean muskuluan. Amitriptilinarene hidrofobikotasuna kontuan hartuta ($\log K_{ow} = 4.81$ pH 7,3an), lipidotan aberatsak diren ehunetan metatze altuagoa espero zitekeen arren, lipidikoak ez diren zakatzetan ere aurkitu dira kontzentrazio altuenetarikoa. Hortaz, ondoriozta daiteke amitriptilinarene akumulazioan bere propietate fisiko-kimikoez gain, bestelako faktoreek ere garrantzia dutela. Amitriptilina droga psikoaktiboa dela kontuan hartuta, garunean behatutako kontzentrazioak logikoak dirudite. Gainera, depresioaren kontrako beste hainbat farmakorekin egindako esperimentuetan ere antzeko emaitzak aurkitu dira bibliografian, hau da, drogaren metaketa garunean gertatu den bitartean, metabolizazioa gibelean nagusitu da (Brooks et al., 2005; Nallani et al., 2016; Schultz et al., 2011; Tanoue et al., 2015). Bestalde, kontuan hartuta amitriptilinarene plasmako kontzentrazioak zakatzetakoak baino altuagoak izan direla, eta bi kontzentrazioen artean korrelazio positibo altua behatu dela ($r > 0,98$), ondoriozta daiteke amitriptilinarene absortzioa zakatzetatik eman dela nagusiki, eta ez hesteetatik (Qiao et al., 2000).

1. Irudia. Plasma, behazun (ng/ml-an) eta ehun biologiko desberdinetan (ng/g-an) behatu diren amitriptilina kontzentrazioak kontzentrazio altuko (a) eta baxuko (b) esposizio-esperimentuetan.



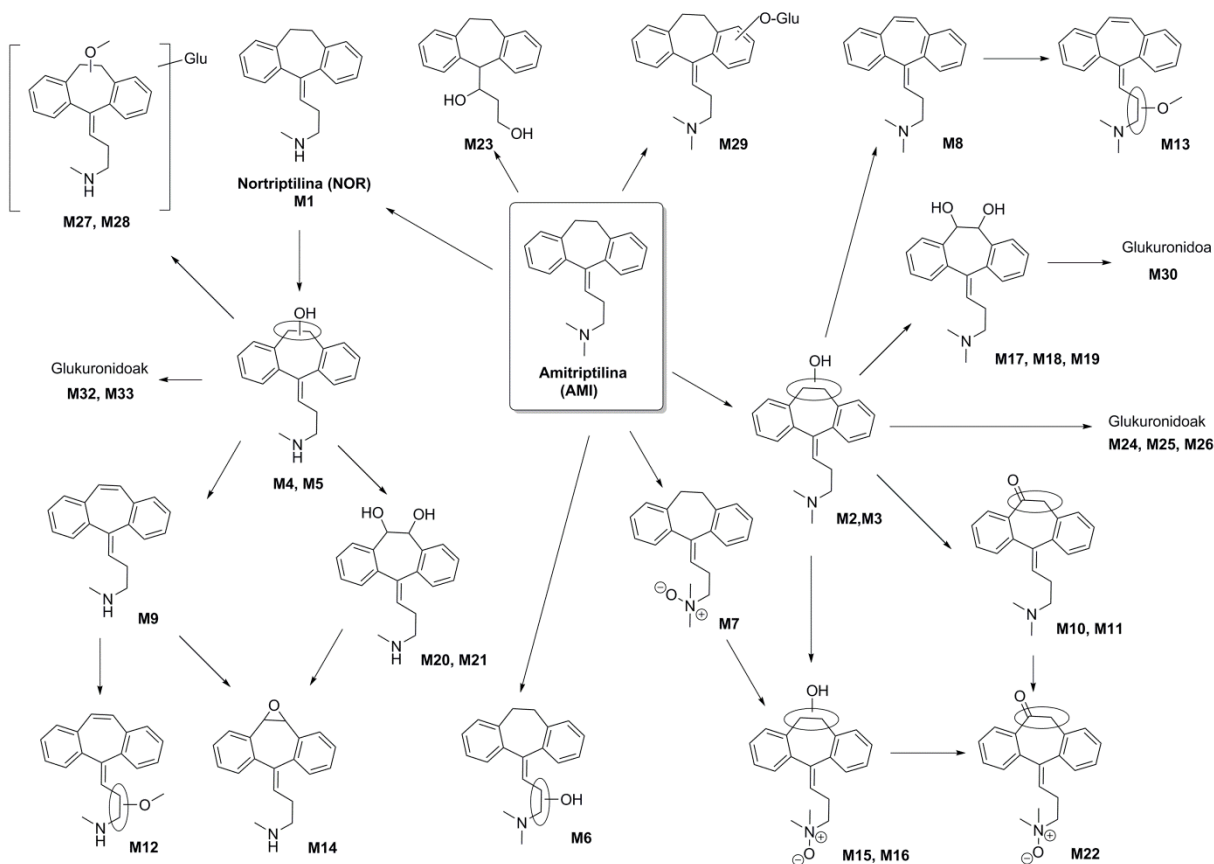
Orokorrean egun desberdinetako biokontzentrazio faktoreak ($BCF = \text{kontzentrazioa ehun biologikoan} / \text{kontzentrazioa uretan}$) konparagarriak izan dira (p balioa > 0,05), bai kontzentrazio

altuko zein baxuko esperimentuetan eta horrek orekara heldu izana adierazten du. Bestalde, bi esperimentuak erkatzean, ondorioztatu da kontzentrazioarekiko menpekotasuna dagoela, garuneko, zakatzetako eta gibleko BCFak baxuagoak izan baitira kontzentrazio altuko esperimentuan. Horren arrazoa amitriptilinen metabolizazioarekin erlazionatuta egon daiteke, farmakoaren presentzia altuan sortutako oxigenodun espezie errektiboen gorakadak bultzatuta (Xu et al., 2015).

3.3 Amitriptilinen metabolizazio-bidea eta metabolitoen distribuzioa urraburu arrainen ehun eta jariakin biologiko desberdinetan

Amitriptilinen metabolizazio-bidean adierazitako 1. eta 2. faseko metabolitoen egiturak 2. irudian ikus daitezke. Metabolitoen identifikazio probablea bereizmen altuko masa-espektrometriaren bidez aurrera eraman da konposatuaren masa zehatza eta fragmentazioa kontuan izanik. 33 metabolito determinatu dira, eurretatik 10 lehen aldiz bibliografian deskribatutakoak.

2. irudia. Amitriptilinen metabolizazio bidea urraburu arrainen.



Amitriptilinen metabolitoak behazunean (29), giblean (21) eta plasman (19) behatu dira nagusiki. Kontuan izan behar da gibela dela farmakoaren metabolizazioaren gune nagusia eta bertan sortutako metabolitoek zirkulazio sistemikoa (plasmaren bidez, adibidez) edo eliminazioa (behazunaren bidez) pairatuko dutela. Behazunak hesteetan eta giblean sortutako metabolitoak biltzen ditu eta normala da bertan metabolito gehien behatzea.

Amitriptilinen eta bere metabolitoen ugaritasuna erkatu ahal izateko hurbilketa bat egin behar izan dugu, metabolitoen estandarrak ez baititugu eskuragarri. Hurbilketa horretan, konposatu bakoitzak duen seinalea hartu dugu erantzun analitiko gisa, eta ugaritasunak zehazterako orduan detektagailuak konposatu bakoitzarentzat duen sentikortasuna edo seinale instrumentala berdintzat jo dugu. Honela, ikusi da zakatzetan eta garunean amitriptilina bera dela konposaturik ugariena (%30 eta %40, hurrenez hurren). Zakatzetan amitriptilinen absortzioa gertatzen da, eta ondorioz, konposatuaren kontzentrazio altuak espero dira. Bestalde, garunera heltzeko amitriptilina eta bere

metabolitoek muga hematoentzefalikoa zeharkatu behar dute difusioz, eta prozesu hori errazago gertatzen da amitriptilinarentzat, 1. eta 2. faseko metabolito polarragoentzat baino. Gibelaren kasuan M2 amitriptilinarenera eratorri monohidroxilatua izan da metabolitorik ugariena (% 30), eta ez da harritzekoa, bibliografian sakon deskribatuta baitago amitriptilinarenera hidroxilazioa eraztun zentralako endozikloaren etileno taldean (Breyer-Pfaff, 2004). Plasman, ordea, M10 (M2-ren deshidrogenazio produktua) izan da metabolitorik ugariena (% 33). Behazunaren kasuan, amitriptilina oso portzentaia txikian agertu da (% 2an) eta 2. faseko M24 eta M26 glukuronido eratorriak izan dira ugariena (% 30), hain zuzen ere, M2/M3 monohidroximetabolitoen eratorriak direnak. Azkenik, azpimarratzekoa da giza-germuan egindako azterketekin eta *in vitro* egindako beste ikerketa batzuekin alderatuz (Rousu et al., 2010; Zhou et al., 2016), metabolito guztiak ez direla berdinak izan. Horrela, ondorioztatu dezakegu metabolizazioak espeziarekiko menpekotasuna duela.

4. Ondorioak

Lan honetan depresioaren aurka erabiltzen den amitriptilina farmako triziklikoa ingurumenaren kutsatzaile moduan aztertu da, araztegiaren ez baita bera bezalako konposatuaren erabateko eliminazioa gertatzen. Emaitzek argi utzi dute amitriptilina zakatzetatik sartu dela arrainetara, eta plasman zehar garraiatuz, nagusiki garunean metatu dela. Bestalde, kutsatzailearen metabolizazioa gibelean gertatu den arren, metabolito berriak identifikatzeko plasma eta behazuna ere oso interesgarriak dira, metabolitoen zirkulazioan eta eliminazioan duten funtzioagatik. Urraburuen adibide honetan 33 metabolizazio-produktu identifikatu dira, eta horietatik 10 bibliografian lehen aldiz deskribatutakoak izateak metabolizazioa espezie-espezifikoa dela adierazten du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Baldintza kontrolatuetan aurrera eramanez lan honetan bi gauza agerian geratu dira. Alde batetik, ura aztertzeaz gain oso garrantzitsua dela arrainak edo bestelako ur-espezieak monitorizatzea, horietan kutsatzaileak metatzeko gaitasun handia erakusten baitu. Eta bestetik, akumulazio osoa aztertzeke ez dela nahikoa jatorrizko kutsatzailea soilik aztertzea, baizik eta beharrezkoa dela sortutako metabolitoen identifikazioa burutzea. Izan ere, metabolizazio-produktuek ere toxikotasunean eragina izan dezakete eta ingurumenerako arrisku kimikoen ebaluazioan sartu beharko lirateke.

6. Bibliografia

- Baker, D.R.; Kasprzyk-Hordén, B. (2013): Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments. *Sci Total Environ*, 454-455; 442-456.
- Breyer-Pfaff, U. (2004): The Metabolic Fate of Amitriptyline, Nortriptyline and Amitriptylinoxide in Man. *Drug Metab.*, 36 (3-4), 723-746.
- Brooks, B. W.; Chambliss, C. K.; Stanley, J. K.; Ramirez, A.; Banks, K. E.; Johnson, R. D.; Lewis, R. J. (2005): Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24 (2), 464-469.
- Daghrir, R.; Drogué, P. (2013): Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett.*, 11; 209-227.
- Lajeunesse, A.; Gagnon, C.; Gagné, F.; Louis, S.; Čejka, P.; Sauvé, S. (2011): Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. *Chemosphere*, 83 (4), 564-571.
- Marcoux M.A.; Matias M.; Olivier F.; Keck G. (2013): Review and prospect of emerging contaminants in water- key issues and challenges linked to their presence in wastewater treatment schemes: general aspects and focus on nanoparticles. *Waste Manag.*, 33; 2147-2156.

- McEneff G.; Schmidt W.; Quinn B. (2014): Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Short Summary of Current Knowledge and the Potential Impacts on Aquatic Biota and Humans. *Epa Research Report*, 142, 1-42.
- Nallani, G. C.; Edziyie, R. E.; Paulos, P. M.; Venables, B. J.; Constantine, L. A.; Huggett, D. B. (2016): Bioconcentration of two basic pharmaceuticals, verapamil and clozapine, in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35 (3), 593–603.
- Qiao, P.; Gobas, F. A.; Farrell, A. P. (2000): Relative contributions of aqueous and dietary uptake of hydrophobic chemicals to the body burden in juvenile rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39 (3), 369–377.
- Rousu, T.; Herttuainen, J.; Tolonen, A. (2010): Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification in vitro – amitriptyline and verapamil as model compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (7), 939–957.
- Schultz, M. M.; Painter, M. M.; Bartell, S. E.; Logue, A.; Furlong, E. T.; Werner, S. L.; Schoenfuss, H. L. (2011): Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.*, 104 (1–2), 38–47.
- Tanoue, R.; Nomiyama, K.; Nakamura, H.; Kim, J.-W.; Isobe, T.; Shinohara, R.; Kunisue, T.; Tanabe, S. (2015): Uptake and Tissue Distribution of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wild Fish from Treated-Wastewater-Impacted Streams. *Environ. Sci. Technol.*, 49 (19), 11649–11658.
- Van Doorslaer, X.; Dewulf, J.; Van Langenhove, H.; Demeestere, K. (2014): Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.*; 500-501; 250-269.
- Xu, H.; Yang, M.; Qiu, W.; Pan, C.; Wu, M. (2013): The impact of endocrine-disrupting chemicals on oxidative stress and innate immune response in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.*, 32 (8), 1793–1799.
- Yang, M.; Qiu, W.; Chen, J.; Zhan, J.; Pan, C.; Lei, X.; Wu, M. (2014): Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. *Aquat. Toxicol.*, 151, 68–76.
- Ziarrusta, H.; Mijangos, L.; Prieto, A.; Etxebarria, N.; Zuloaga, O.; Olivares, M. (2015): Determination of Tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408 (4), 1205–1216.
- Ziarrusta, H.; Mijangos L.; Izagirre U.; Plassmann M.M.; Benskin J.P.; Anakabe E.; Olivares M.; Zuloaga O. (2017): Bioconcentration and Biotransformation of Amitriptyline in Gilt-head Bream. *Environ Sci Technol.* doi: 10.1021/acs.est.6b05831.
- Zhou, X.; Chen, C.; Zhang, F.; Zhang, Y.; Feng, Y.; Ouyang, H.; Xu, Y.; Jiang, H. (2016): Metabolism and bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline in human liver microsomes and human urine. *Bioanalysis*, 8 (13), 1365–1381.

7. Eskerrak eta Aipamenak

Lan hau Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzak diruz lagundu du CTM2014-56628-C3-1-R proiektuaren bitartez. Bestalde, H. Ziarrusta eta L. Mijangos ikerlariak eskerrak eman nahi dizkie Espainiako Ministeritzari eta Eusko Jaurlaritzari beraiei doktoretza aurreko laguntzengatik.

Lan hau bibliografian aipatzen den Ziarrusta et al. 2017 artikulutik eratorria da.