



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



DE
ACIONES
AS

Y
TOS

EVALUACIÓN DE LAS ETAPAS Y LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SOLUBILIZACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO DURANTE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE PRODUCTOS PESQUEROS

Máster en Gestión y Seguridad Alimentaria

Carlos Alberto Jadán Piedra

Directores:
Vicenta Devesa Pérez
Dinoraz Vélez Pacios

Tutor:
Rafael Gavara Clemente.

EVALUACIÓN DE LAS ETAPAS Y LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SOLUBILIZACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO DURANTE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE PRODUCTOS PESQUEROS

Jadán C., Devesa V., Vélez D., Gavara R.¹

RESUMEN

Los peces predadores tienden a acumular altos niveles de mercurio (Hg). Por otro lado, estos productos alimentarios son ricos en selenio (Se), elemento que puede contrarrestar los efectos tóxicos de Hg. El objetivo del presente estudio ha sido evaluar la bioaccesibilidad (fracción del contaminante que solubiliza desde el alimento durante la digestión gastrointestinal) del Hg y Se en pez espada cocinado, e identificar aquellos parámetros de la digestión (pH, concentración de pepsina, etapa de la digestión) que pueden influir en la misma.

Las concentraciones de mercurio en las muestras analizadas oscilan entre 0,23 y 2,82 mg/kg peso húmedo (ph). La bioaccesibilidad del Hg varía entre un 15 y un 85%, siendo el rango de concentraciones en el bioaccesible muy variable (0,21-1,07 mg/kg ph). Las concentraciones de Se oscilan entre 0,46 y 0,98 mg/kg ph, con una bioaccesibilidad en general mayor que la de Hg y menos variable (63-100%; 0,41-0,51 mg/kg ph).

En cuanto a los parámetros que influyen en la solubilización de estos elementos traza a su paso por el tracto gastrointestinal, se pone de manifiesto que la totalidad de la solubilización se produce en la etapa gástrica. Dentro de la etapa gástrica, los pHs ácidos (2-3) y el aumento de la concentración de pepsina suponen una mayor bioaccesibilidad, especialmente para el Hg.

El presente estudio muestra que la consideración de la bioaccesibilidad en lugar de la concentración de Hg en el producto fresco supone una disminución de la exposición al tóxico, y por tanto un menor riesgo asociado a la ingesta de estos productos. También se pone de manifiesto que el estudio de la bioaccesibilidad de Hg y Se debe contemplar aquellos parámetros que se modifican durante la ingesta de alimentos y que como el pH y la pepsina son determinantes.

PALABRAS CLAVE: Bioaccesibilidad, mercurio, selenio, etapa gástrica, etapa intestinal, pH, pepsina.

ABSTRACT

Predatory fish tend to accumulate high levels of mercury (Hg). Additionally, selenium (Se) present in these food products may counteract the toxic effects of Hg. The aim of the present study was to evaluate Hg and Se bioaccessibility (the contaminant fraction that solubilises from its matrix during gastrointestinal digestion) in cooked swordfish and to determine the influence of certain

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7. 46980-Paterna (Valencia), España.

parameters of the gastrointestinal digestion (pH, pepsin concentration, stage of digestion) on Hg and Se bioaccessibility.

The concentrations of Hg in cooked swordfish range between 0,23 and 2,82 mg/kg wet weight (ww). The bioaccessibility varies widely (15-85%), with concentrations in the bioaccessible fraction ranging from 0,21 to 1,07 mg/kg ww. The concentrations of Se vary between 0,46 and 0,98 mg/kg ww, being the bioaccessibility greater and less variable than that observed for Hg (63-100%; 0,41-0,51 mg/kg ph).

The study of the influence of the parameters of the gastrointestinal digestion evidences that the whole solubilisation occurs in the gastric stage. In this gastric step, the acidic pHs (2-3) and the increase of the concentration of pepsin bring about an increase of the bioaccessibility, especially for Hg.

KEYWORDS: Bioavailability, mercury, selenium, gastric phase, intestinal phase, pH, pepsin.

RESUM

Els peixos predadors tendeixen a acumular alts nivells de mercuri (Hg). D'altra banda, aquests productes alimentaris són rics en seleni (Se), element que pot contrarestar els efectes tòxics del Hg. L'objectiu del present estudi ha estat avaluar la bioaccessibilitat (fracció del contaminant que es solubilitza a partir de la seva matriu durant la digestió gastrointestinal) del Hg i Se en peix espasa cuinat, i identificar aquells paràmetres de la digestió gastrointestinal (pH, concentració de pepsina, etapa de la digestió) que poden influir en la mateixa.

Les concentracions de mercuri en les mostres analitzades oscil·len entre 0,23 i 2,82 mg/kg pes humit (ph). La bioaccessibilitat del Hg varia entre un 15 i un 85%, sent el rang de concentracions en el bioaccessible molt variable (0,21-1,07 mg/kg ph). Les concentracions de Se oscil·len entre 0,46 i 0,98 mg/kg ph, amb una bioaccessibilitat en general major que la de Hg i menys variable (63-100%, 0,41-0,51 mg/kg ph).

Quant als paràmetres que influeixen en la solubilització d'aquests elements traça al seu pas pel tracte gastrointestinal, es posa de manifest que la totalitat de la solubilització es produeix en l'etapa gàstrica. Dins de l'etapa gàstrica els pHs àcids (2-3) i l'augment de la concentració de pepsina suposen una major bioaccessibilitat, especialment pel Hg.

El present estudi mostra que la consideració de la bioaccessibilitat en lloc de la concentració de Hg en el producte fresc suposa una disminució de l'exposició al tòxic, i per tant un menor risc associat a la ingesta d'aquests productes. També es posa de manifest que l'estudi de la bioaccessibilitat de Hg i Se ha de contemplar aquells paràmetres que es modifiquen durant la ingesta d'aliments i que com el pH i la pepsina són determinants.

PARAULES CLAU: Bioaccessibilitat, mercuri, seleni, etapa gàstric, etapa intestinal, pH i pepsina.

INTRODUCCIÓN

La principal exposición a mercurio (Hg) para gran parte de la población se produce a través de los alimentos. Los predadores marinos como pez espada, atún de gran tamaño, tiburón y marrajo son los que contribuyen en mayor medida a la ingesta de Hg (SANCO, 2004). El metilmercurio (MeHg), forma mercurial mayoritaria en estos alimentos, está considerada un posible cancerígeno para el hombre por la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (Grupo 2B, volumen 58. IARC, 1993), además de ser un importante neurotóxico (Grandjean et al., 2010). Su efecto sobre el sistema nervioso, especialmente durante el desarrollo, ha hecho que en los últimos años agencias responsables de la salud y la seguridad alimentaria recomienden la disminución de la ingesta de estos productos pesqueros por parte de los considerados grupos de riesgo (población infantil, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia) (AESAN, 2011).

Varios estudios epidemiológicos han vinculado la ingesta elevada de MeHg a través de los productos pesqueros con el desarrollo de determinadas patologías (Poulin y Gibb, 2008). En un artículo reciente (Grandjean et al., 2011) se discuten estos estudios y se indica que hay demasiadas incertidumbres en los mismos como para confirmar la relación directa entre la ingesta de MeHg a través de los alimentos y la prevalencia de patologías. Uno de los hechos que cuestionan esta relación es que en muchos casos los productos pesqueros con elevados contenidos de MeHg son también importantes fuente de otros nutrientes, como los ácidos grasos poliinsaturados, así como de elementos con demostrado carácter antagonista del efecto tóxico del Hg, como el selenio (Se). Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el exceso molar de Se respecto a Hg, disminuye el efecto tóxico de la forma mercurial (Newland et al., 2006).

El Hg y Se presentes en los productos pesqueros se encuentran unidos principalmente a proteínas y por tanto su absorción depende de su solubilización durante el paso del alimento por el tracto digestivo. La digestión gastrointestinal consiste en una serie de etapas enzimáticas a distintos pHs que disgregan el alimento y liberan los nutrientes y tóxicos que lo integran, favoreciendo así su posterior absorción intestinal. Los estudios sobre la bioaccesibilidad (solubilización de un compuesto tras la digestión gastrointestinal) del Hg desde los alimentos se han centrado principalmente en productos pesqueros (Calatayud et al., 2012). Estos estudios muestran una alta variabilidad de la fracción de Hg solubilizada, independientemente del producto alimentario evaluado. Por otra parte, se ha evidenciado que el cocinado reduce la solubilización de Hg tras la digestión gastrointestinal (Torres-Escribano et al., 2011) y que determinados componentes de la dieta también reducen la bioaccesibilidad final del elemento traza (Shim et al., 2009; He y Wang, 2011). En cuanto al Se los estudios de bioaccesibilidad se han llevado en distintos productos alimentarios, con especial énfasis en vegetales, cereales y productos pesqueros (Jaiswal et al., 2011; Moreda et al., 2011; Calatayud et al., 2012). Al igual que ocurre con el Hg, la bioaccesibilidad del selenio depende de factores tales como el cocinado y tipo de matriz alimentaria (Moreda et al., 2011).

Los estudios de bioaccesibilidad se realizan mediante ensayos *in vitro*. Existen numerosos modelos *in vitro* estáticos y dinámicos, que intentan emular este complejo proceso. Las metodologías existentes no tratan de reproducir fielmente las condiciones de cada uno de los compartimentos del tracto digestivo, sino más bien intentan mimetizar algunos de los procesos y/o factores claves de la digestión gastrointestinal (Ng et al., 2010). Los modelos dinámicos, aunque más cercanos a la realidad pues permiten trabajar modificando variables claves en las etapas de digestión, requieren instrumental no disponible en la mayoría de laboratorios, manejan volúmenes de muestra que en ocasiones impiden una adecuada determinación del analito y sólo permiten procesar un número reducido de muestras en tiempos razonables. En consecuencia la mayor parte de las investigaciones sobre elementos traza tóxicos utiliza modelos estáticos (Morera et al., 2010). Sin embargo, la simplificación de los modelos estáticos impide evaluar el efecto del pH, tiempo de residencia del alimento en el tracto o las variaciones de los niveles enzimáticos durante el proceso digestivo. Por tanto, se desconoce si estos factores pueden influir en la solubilización del Hg y Se presente en los productos pesqueros y por ello si los modelos *in vitro* existentes son adecuados para evaluar la bioaccesibilidad de estos elementos traza desde los alimentos.

El objetivo de presente proyecto es la evaluación de la bioaccesibilidad del Hg y Se presente en muestras de pez espada cocinado y la identificación de las etapas (gástrica o intestinal) y algunos de los factores de la digestión gastrointestinal (pH y concentraciones de pepsina) que pueden influir de forma más determinante en la bioaccesibilidad de ambos elementos traza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos

La mineralización por vía húmeda de las muestras para el análisis de Hg se llevó a cabo empleando un sistema de microondas de reacción acelerada (MARS) (CEM, Vertex, España). La cuantificación de Hg se realizó mediante un espectrómetro de fluorescencia atómica con vapor frío, CV-AFS (Millennium Merlin PSA 10.025, PS Analytical, Reino Unido).

La mineralización por vía seca para el análisis de Se se realizó en un horno mufla (K1253, Heraeus, España). Para la cuantificación se utilizó un espectrómetro de fluorescencia atómica con generación de hidruros, HG-AFS (Millennium Merlin, PSA Analytical).

Otros equipos utilizados incluyeron: un baño de arena (PL 5125, Raypa, Scharlau, España), un agitador mecánico (KS 125 Basic, IKA Labortechnik, Merck, España), un medidor de pH (pH 526, Multical, España), un baño de agua termostataado (Unitronic Orbital C, J.P. Selecta, España) y una centrífuga (RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall, Du Pont, EEUU).

Reactivos.

Para la preparación de estándares y reactivos se utilizó agua desionizada (18,2 MΩ cm), obtenida mediante el sistema Milli Q (Millipore Inc., Millipore

Ibérica, España). Todos los reactivos empleados fueron al menos de grado analítico.

Las curvas de calibrado para la cuantificación de Hg y Se se prepararon a partir de soluciones estándar de 1000 mg/L de Hg(II) [Hg(NO₃)₂, VWR, España] y Se(IV) (SeO₄, Merck, España).

Para los ensayos de bioaccesibilidad se empleó agua de grado celular (B. Braun Medical S.A., España) Los enzimas y las sales biliares utilizados se adquirieron en Sigma (Sigma-Aldrich, España): pepsina porcina (actividad enzimática 944 U/mg proteína), pancreatina porcina (actividad equivalente a 4 x especificaciones de la Farmacopea Estadounidense/mg pancreatina) y extracto biliar (glicina, conjugados de taurina y otras sales biliares).

Otros reactivos utilizados fueron: ácido clorhídrico (Merck), ácido nítrico (Merck), hidróxido de sodio (Merck), óxido de magnesio (Prolabo, España), nitrato de magnesio (VWR), borohidruro de sodio (Panreac, España), peróxido de hidrógeno (VWR), bicarbonato de sodio (Guinama, España) y cloruro de estaño (II) dihidratado (Scharlab, Scharlau Chemie, España). Todo el material empleado se trató con 10% (v/v) de HNO₃ durante 24 h y se enjuagó tres veces con agua desionizada antes de su uso.

Muestras analizadas y modo de preparación.

Se analizaron un total de 12 muestras de pez espada (*Xiphia gladius*) adquiridas en comercios de la ciudad de Valencia. Todas ellas correspondían a rodajas de producto descongelado con un peso medio aproximado de 120 – 150 g.

El pescado fue cocinado en la sartén sin empleo de ingredientes adicionales. Posteriormente se eliminaron las partes no comestibles y las muestras resultantes se trituraron, homogenizaron y almacenaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

Método de simulación de digestión gastrointestinal.

APLICACIÓN DE LA DIGESTIÓN IN VITRO. CÁLCULO DE LA BIOACCESIBILIDAD.

Las muestras cocinadas se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. El método de digestión empleado fue una modificación del método descrito por Laparra et al. (2003). Brevemente, se pesaron 10 g de muestra y se añadieron 90 g de agua de grado celular, ajustando el pH a 2,0 con HCl 6 mol/L. Posteriormente se adicionó una solución de pepsina preparada en el momento (1 g de pepsina en 10 mL de HCl 0,1 mol/L) para conseguir 0,02 g de pepsina/10 g de muestra. Finalmente la mezcla se llevó a un peso de 100 g con agua de grado celular y se incubó a 37 °C durante 2 h en continua agitación (120 golpes/min).

Tras la simulación de la etapa gástrica, el digerido se enfrió a 4 °C y el pH se aumentó a 6,5 empleando NaHCO₃ 1 mol/L. Posteriormente se añadió una mezcla de pancreatina y extracto biliar (0,2 g de pancreatina y 1,25 g de extracto biliar en 50 mL de NaHCO₃ 0,1 mol/L) para conseguir una

concentración final de 0,0025 g de pancreatina y 0,015 g de extracto biliar/10 g de muestra. La mezcla se llevó a 100 g con agua de grado celular y se incubó a 37 °C durante 2 h en agitación.

Tras la digestión, las muestras se transfirieron a tubos de centrifuga de polipropileno y se centrifugaron a 10000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. El esquema del proceso de digestión se muestra en la figura 1.

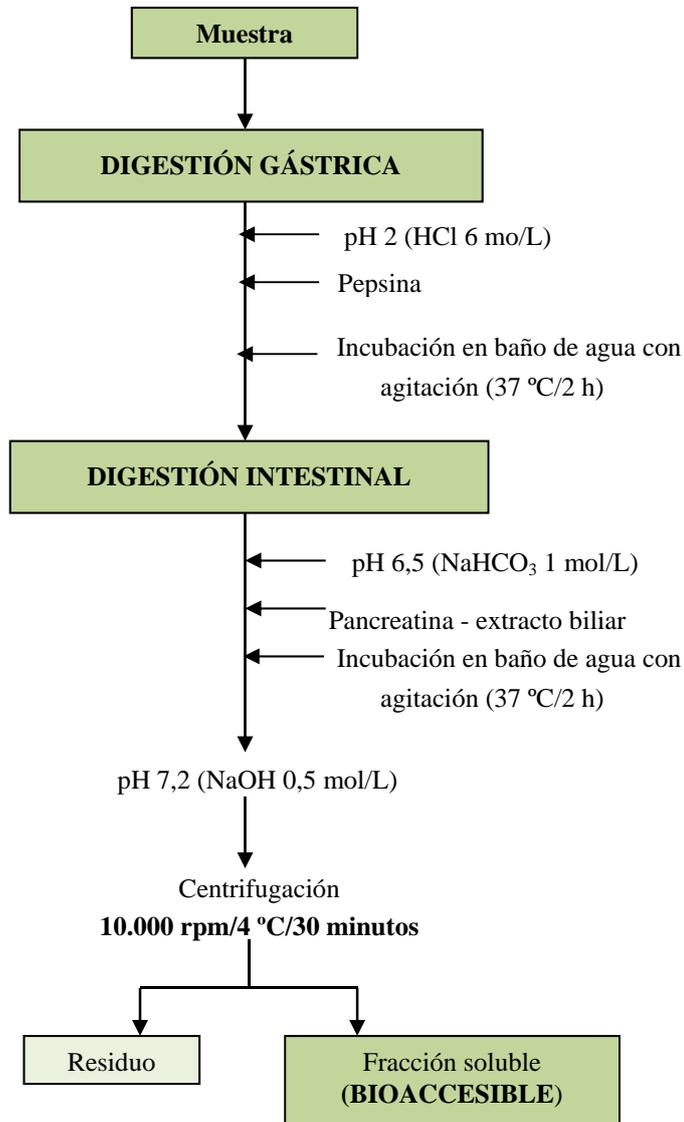


FIGURA 1. Esquema del modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

En la fracción soluble obtenida (bioaccesible) se cuantificaron los contenidos totales de Se y Hg, y se determinó la bioaccesibilidad empleando la ecuación 1.

$$\text{Bioaccesibilidad} = [A/B] \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

donde: A = contenido de Hg ó Se en la fracción bioaccesible
B = contenido de Hg ó Se en el producto cocinado

INFLUENCIA DE LA ETAPA DE DIGESTIÓN EN LA SOLUBILIZACIÓN DE Hg Y Se.

Para evaluar la influencia de la etapa de digestión (gástrica o intestinal) en la bioaccesibilidad se analizaron 5 muestras. De cada muestra se destinó una porción (10 g) al proceso completo de digestión gastrointestinal tal y como se describe en el apartado 4.1 y otra porción (10 g) únicamente a la etapa gástrica. En este último caso, las muestras tras la digestión con pepsina durante 2 h, fueron centrifugadas a 10000 rpm, 30 minutos a 4 °C, determinándose el Se y Hg en el sobrenadante. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. El esquema de trabajo se muestra en la figura 2.

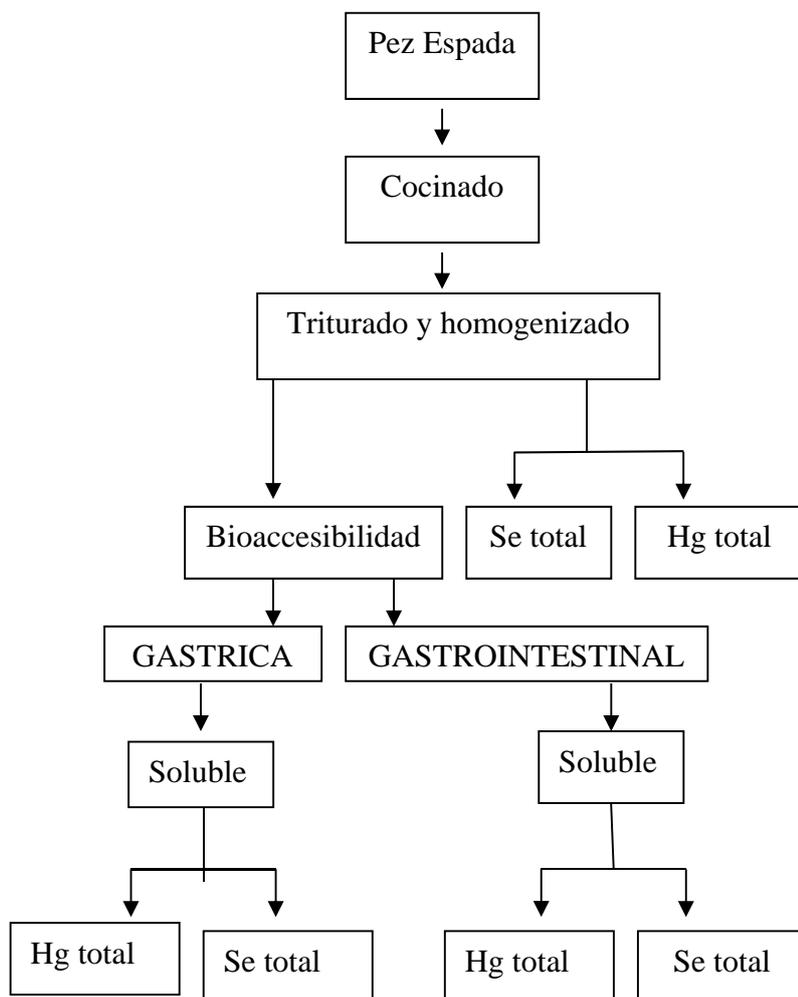


FIGURA 2. Esquema de trabajo del estudio de la influencia de la etapa de digestión en la solubilización de Hg y Se.

INFLUENCIA DEL pH EN LA SOLUBILIZACIÓN DE Hg Y Se DURANTE LA ETAPA GÁSTRICA.

La influencia del pH se evaluó en la etapa gástrica empleando 2 muestras de pez espada cocinadas. Cada muestra se separó en 5 porciones de 10 g para ensayar distintos pHs (2, 3, 4, 5 y 6). A cada porción se le añadió 90 g de agua de grado celular, ajustando la muestra al pH de interés con HCl 6 mol/L. Tras llevar la muestra a 100 g con agua de grado celular se aplicó la etapa de digestión gástrica, tal y como se describe en el apartado 4.1. El digerido obtenido se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y posteriormente se analizaron los contenidos de Hg y Se en la fracción soluble. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE PEPSINA EN LA SOLUBILIZACIÓN DEL Hg Y Se DURANTE LA ETAPA GÁSTRICA.

La influencia de la concentración de pepsina se evaluó en la etapa gástrica empleando dos aproximaciones. En una primera aproximación se analizó la influencia de la presencia o no de pepsina a distintos pHs (2, 4 y 6). Para llevar a cabo este estudio se emplearon dos muestras de pez espada cocinadas y homogenizadas, las cuales se dividieron en 6 porciones de 10 g que se sometieron a la digestión gástrica descrita en el apartado 4.1. Los resultados de la primera aproximación, centraron los estudios en el pH donde había una mejor respuesta a la presencia de pepsina. Así la segunda aproximación se realizó sólo a pH 2, empleando diferentes concentraciones de pepsina (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0,13 g pepsina/10 g muestra fresca, para un volumen de ensayo de 100 mL). En esta segunda aproximación se emplearon 2 muestras cocinadas. Cada una de ellas se dividió en 6 porciones de 10 g, que se sometieron a la etapa gástrica empleando distintas concentraciones de pepsina.

Determinación de Hg.

Las muestras cocinadas (0,5 g) y las fracciones bioaccesibles (4 mL) fueron tratadas con 4 mL de HNO₃ 14 mol/L y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v) en un microondas operando a 800 W. Tras la digestión, las muestras se transfirieron a vasos de precipitado, los cuales se mantuvieron abiertos durante 12 h para conseguir la evaporación de vapores nitrosos y reducir, de esta forma, posibles interferencias en la lectura.

Las condiciones analíticas empleadas para la determinación de Hg mediante CV-AFS fueron las siguientes: agente reductor, 2% (m/v) SnCl₂ en 1,8 mol/L HCl, 4,5 mL/min; reactivo blanco, HCl 0,6 mol/L, 9 mL/min; gas portador, argón, 0,3 L/min; gas de secado, aire, 2,5 L/min; tiempo de demora, 15 s; tiempo de medida, 40 s; tiempo de retorno a línea base, 60 s; rango de amplificación, 100; filtro, 32. En todos los ensayos, el control de calidad de las medidas se realizó mediante el análisis del material de referencia certificado (QCI-049-1 Trace Metals AA Sample 1, LCG Standards, España, valor certificado: 40,8 ± 1,19 µg/L).

Determinación de Se.

Las muestras cocinadas (1 g) y las fracciones bioaccesibles (10 mL) fueron tratadas con 1 mL de agente de mineralización (20% m/v $MgNO_3$ + 2% m/v MgO) y 5 mL de 7 mol/L HNO_3 (v/v). Las muestras tratadas se evaporaron en un baño de arena hasta sequedad y se mineralizaron empleando un horno mufla. La temperatura inicial del horno (150 °C) se incrementó progresivamente (50 °C/h) hasta alcanzar (425 ± 25) °C. Esta temperatura se mantuvo durante 12 horas. El proceso de mineralización se repitió hasta conseguir cenizas blancas mediante la adición de 5 mL de 7 mol/L HNO_3 (v/v).

Las cenizas blancas obtenidas se disolvieron en 5 mL de HCl 6 mol/L y 5 mL de agente reductor (5% m/v KI + 5% m/v ácido ascórbico). Tras 30 minutos, la solución se llevó a volumen final con HCl 6 mol/L y se filtró con papel de filtro Whatman No. 1. La reducción de Se (VI) a Se (IV) para su lectura se llevó a cabo por calentamiento en baño a 90 °C durante 20 min.

Las condiciones analíticas empleadas para la determinación de Se mediante HG-AFS fueron las siguientes: agente reductor, 1,2% $NaBH_4$ en 0,4% NaOH (m/v), 4,5 mL/min; reactivo blanco, HCl 4,5 mol/L, 9 mL/min; gas portador, argón, 0,13 L/min; gas de secado, aire, 2,5 L/min, tiempo de demora, 15 s; tiempo de medida, 30 s; tiempo de retorno a línea base, 60 s; rango de amplificación, 10; filtro, 32. En todos los ensayos, el control de calidad de las medidas se realizó mediante el análisis del material de referencia (QCI-049-1 Trace Metals AA Sample 1, valor certificado: 27,5 ± 0,843 µg/L).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores con comparaciones múltiples post hoc empleando el test HSD de Tukey (SigmaPlot, versión 12). Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$.

RESULTADOS

Contenidos de Hg y Se en pez espada cocinado

La tabla 1 muestra los contenidos de Hg y Se en las muestras de pez espada cocinadas, así como los ratios molares Hg/Se. Los contenidos de Hg oscilan entre 0,23 y 2,82 mg/kg peso húmedo (ph), similares a los hallados por otros autores en este tipo de producto pesquero (0,031 - 4,2 mg/Kg ph; Plessi et al., 2001; Cabañero et al., 2004, 2005 ,2007; Branco et al., 2007; Torres Escribano et al., 2010; Yamashita et al., 2011; Calatayud et al., 2012). Tras el cocinado, el 50% de las muestras superan el límite de Hg permitido por la legislación vigente en España para esta especie de pescado cruda (1 mg/kg ph) (Reglamento CE No 1881/2006).

Los contenidos de Se oscilan entre 0,46 y 0,98 mg/Kg ph. Algunas de las muestras presentan valores superiores a los observados por otros autores en este mismo tipo de producto (0,25 - 0,70 mg/Kg ph, Plessi et al., 2001; Cabañero et al., 2004, 2005 ,2007; Branco et al., 2007; Yamashita et al., 2011; Calatayud et al., 2012).

Las relaciones molares Hg/Se, parámetro que se emplea para evaluar riesgos/beneficios de la ingesta de un producto con Hg, varían entre 0,19 y 2,28. Se considera que un exceso molar de Se respecto a Hg, y por tanto, un ratio inferior a la unidad, podría proteger del efecto tóxico del Hg. De las 6 muestras que superaban el límite legislado para Hg, sólo 3 presentan un ratio molar superior a la unidad. Otros estudios también muestran que productos pesqueros correspondientes a peces predadores con concentraciones de Hg superiores a la legislada y que por tanto, no podrían comercializarse, presentan valores del ratio molar Hg/Se inferiores a la unidad (Plessi et al., 2001; Endo et al., 2002; Cabañero et al., 2007; Kaneko y Ralston., 2007; Burger y Gochfeld, 2011).

TABLA 1. Concentraciones de Hg y Se (expresados como mg/kg peso húmedo, ph) y valores del ratio molar Hg/Se en muestras de pez de espada cocinadas (media \pm desviación estándar, n=12).

Muestra	Hg	Se	Ratio Molar Hg/Se
1	2,82 \pm 0,27	0,49 \pm 0,04	2,28
2	0,42 \pm 0,02	0,50 \pm 0,03	0,38
3	1,27 \pm 0,03	0,46 \pm 0,01	1,08
4	0,92 \pm 0,002	0,67 \pm 0,07	0,54
5	1,41 \pm 0,08	0,63 \pm 0,001	0,88
6	0,62 \pm 0,05	0,71 \pm 0,03	0,35
7	1,88 \pm 0,18	0,98 \pm 0,12	0,76
8	0,23 \pm 0,006	0,48 \pm 0,02	0,19
9	1,67 \pm 0,04	0,83 \pm 0,001	0,79
10	2,50 \pm 0,04	0,74 \pm 0,001	1,32
11	0,91 \pm 0,001	0,57 \pm 0,008	0,63
12	0,73 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02	0,44

Influencia de etapa digestiva sobre la bioaccesibilidad de Hg y Se.

Las figuras 3 y 4 muestran respectivamente los contenidos de Hg y Se en las muestras cocinadas, así como los contenidos de las fracciones bioaccesibles tras someter el alimento a una digestión gástrica o gastrointestinal.

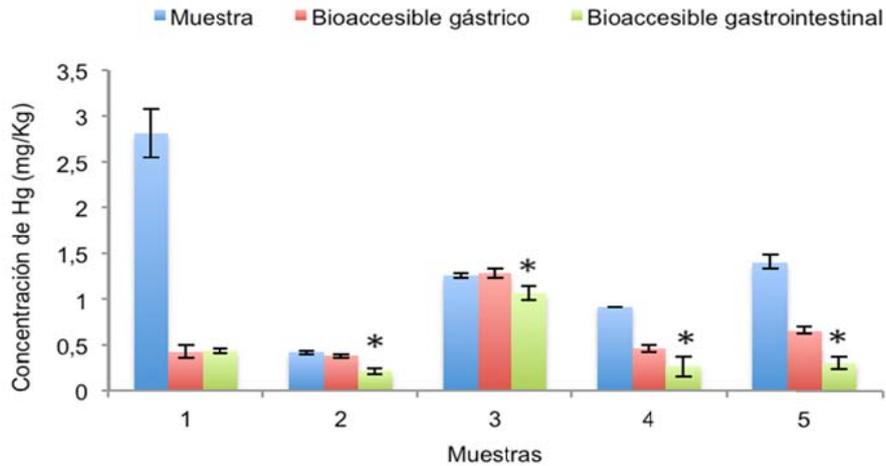


FIGURA 3. Concentraciones de Hg en muestras de pez espada (barras azules) y en la fracción bioaccesible tras aplicación de una digestión gástrica (barras rojas) o gastrointestinal (barras verdes). Valores expresados en mg/Kg ph (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los contenidos bioaccesibles de la etapa gástrica y gastrointestinal.

Los contenidos de Hg en la fracción bioaccesible procedente de la etapa gástrica oscilan entre 0,38 y 1,29 mg/kg ph. Los contenidos solubilizados tras la digestión gastrointestinal muestran en general una disminución estadísticamente significativa con respecto a la digestión gástrica, con valores entre 0,21 y 1,07 mg/kg ph. La bioaccesibilidad tras la aplicación de todo el proceso digestivo oscila entre 15 y 85%. Investigaciones previas sobre la bioaccesibilidad gastrointestinal de Hg en pez espada muestran una menor variabilidad de los contenidos bioaccesibles (55 – 83%; Torres Escribano et al., 2009; Calatayud et al., 2012).

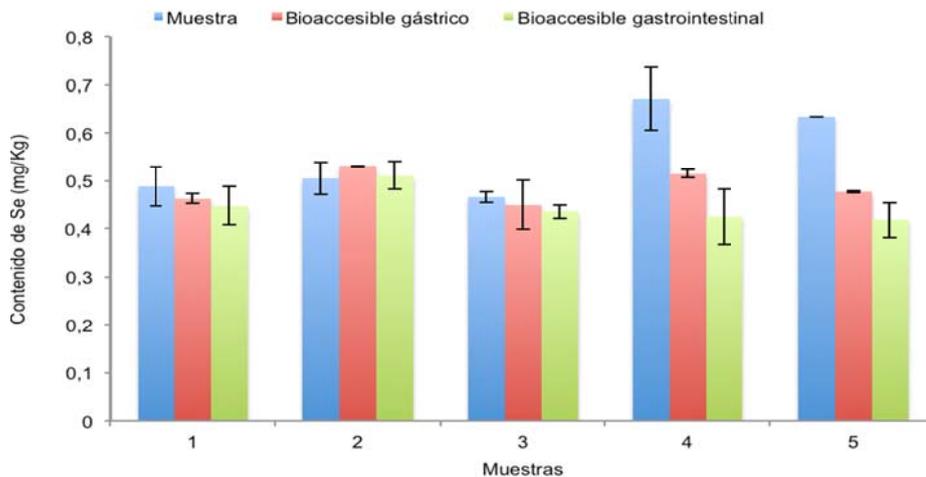


FIGURA 4. Concentraciones de Se en muestras de pez espada (barras azules) y en la fracción bioaccesible tras aplicación de una digestión gástrica (barras rojas) o gastrointestinal (barras verdes). Valores expresados en mg/Kg ph (media \pm desviación estándar, n=3).

Los contenidos de Se en la fracción procedente de la digestión gástrica oscilan entre 0,46 y 0,53 mg/Kg peso húmedo. Tras la digestión gástrica se solubiliza entre un 75 y un 100% del Se presente en el pez espada. La bioaccesibilidad del Se es en general mayor que la observada para el Hg, hecho que ya documentan otros estudios en el mismo tipo de pescado (Cabañero et al., 2004; Calatayud et al., 2012). Los contenidos de Se bioaccesible tras aplicar la digestión completa (0,41-0,51 mg/Kg ph) no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) a los obtenidos tras la digestión gástrica, con una bioaccesibilidad entre el 63 y 100 %.

Los resultados muestran que la solubilización del Hg y Se en el pez espada se produce principalmente durante la etapa gástrica. Durante la etapa intestinal no aumenta la solubilización de estos elementos, incluso en el caso de Hg supone un ligero descenso de los contenidos en la fracción soluble respecto a los hallados a la etapa gástrica. Los ratios molares de Hg/Se en la fracción bioaccesible obtenida tras la digestión completa son en todas las muestras inferiores a la unidad (0,16 y 0,97).

Influencia del pH de la etapa gástrica sobre la bioaccesibilidad de Hg y Se.

La figura 5 muestra el porcentaje de bioaccesibilidad del Hg y Se tras aplicar la etapa gástrica a distintos pHs. Los resultados ponen de manifiesto que el pH es un factor determinante, especialmente en la bioaccesibilidad del Hg, ya que a pH mayores o iguales que 4 este elemento traza no se solubiliza durante la digestión. Para el Se, el descenso es menos acentuado pasando de una solubilización del 100% a pH 2 a un 60% a pH 4. A partir de pH 4, la bioaccesibilidad de este elemento no es dependiente del pH.

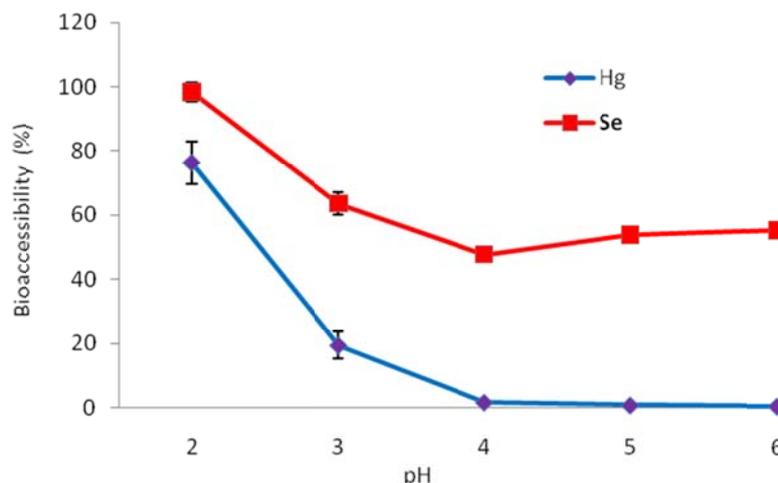


FIGURA 5. Bioaccesibilidad del Hg y Se en muestras de pez de espada cocinadas en función del pH aplicado durante la etapa gástrica. Valores expresados como porcentajes respecto al contenido inicial del producto cocinado (media \pm desviación estándar, $n=3$).

Influencia de la concentración de pepsina en la etapa gástrica sobre la bioaccesibilidad de Hg y Se.

Para el Hg se pone de manifiesto que a pH 2 y 4 la solubilización es significativamente superior ($p < 0,05$) en presencia de pepsina. A pH 6 no existen diferencias significativas ($p > 0,05$), pero la cantidad solubilizada es despreciable. En el Se, la presencia de pepsina solamente produce cambios significativos en la bioaccesibilidad cuando la etapa gástrica se lleva a cabo a pH 2.

TABLA 2. Concentraciones de Hg y Se en muestras de pez espada y en la fracción bioaccesible tras aplicación de la etapa gástrica a distintos pHs. Valores expresados en mg/Kg ph (media \pm desviación estándar, n=3)

Concentración inicial	pH 2		pH 4		pH 6	
	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina
Hg						
1,67 \pm 0,04	1,60 \pm 0,14	0,18 \pm 0,03	0,030 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,014 \pm 0,004	0,004 \pm 0,001
2,50 \pm 0,04	1,38 \pm 0,26	0,05 \pm 0,02	0,030 \pm 0,002	0,01 \pm 0,001	<0,002	<0,002
Se						
0,833 \pm 0,001	0,83 \pm 0,02	0,37 \pm 0,04	0,41 \pm 0,013	0,420 \pm 0,034	0,420 \pm 0,003	0,420 \pm 0,006
0,743 \pm 0,001	0,67 \pm 0,06	0,30 \pm 0,05	0,38 \pm 0,01	0,380 \pm 0,005	0,420 \pm 0,004	0,40 \pm 0,02

Teniendo en cuenta que los efectos más marcados relacionados con la presencia o no de pepsina se ponen de manifiesto a pH 2, se ha evaluado la influencia a pH 2 de la concentración de pepsina empleada en la digestión gástrica. Las figuras 6 y 7 muestran respectivamente los contenidos bioaccesibles de Hg y Se obtenidos tras aplicar la digestión gástrica a distintas concentraciones de pepsina.

Para el Hg, en las dos muestras analizadas se pone de manifiesto que hasta concentraciones de pepsina de 0,06 g, un aumento en la concentración de pepsina supone un incremento en el contenido solubilizado. Para el Se en cambio, no se observa un efecto de la concentración de pepsina en la solubilización.

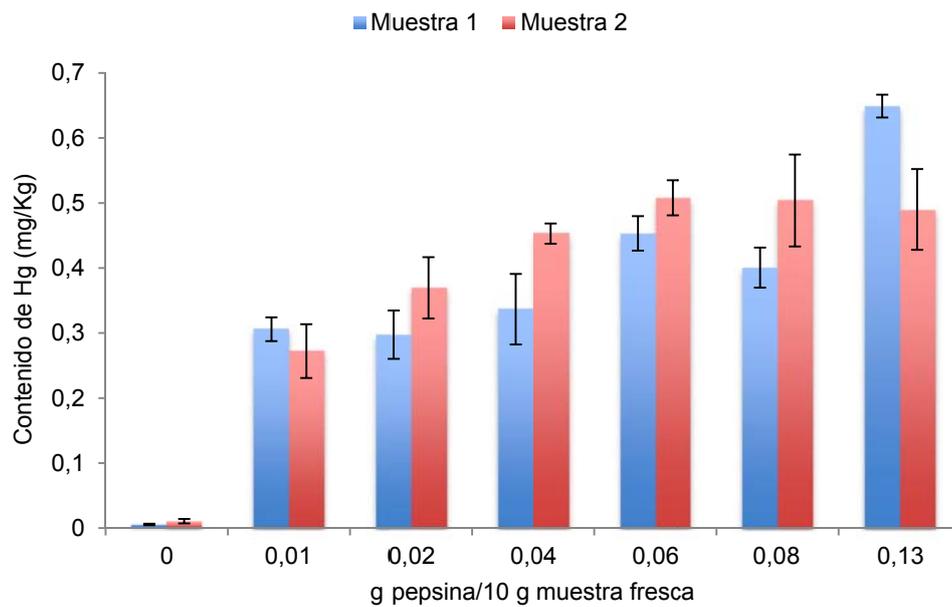


FIGURA 6. Concentraciones de Hg en la fracción bioaccesible tras aplicación de la etapa gástrica con distintas concentraciones de pepsina. Valores expresados en mg/Kg ph (media \pm desviación estándar, n=3).

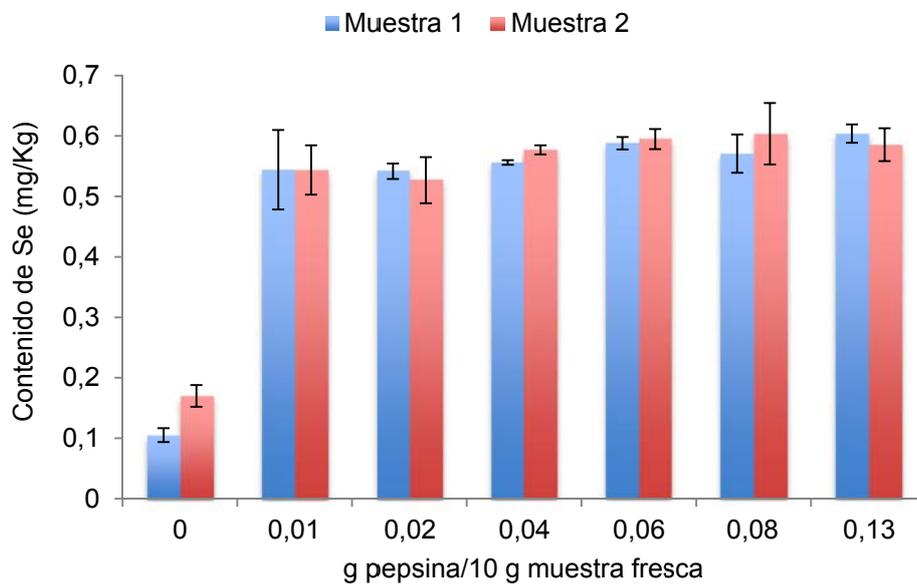


FIGURA 7. Concentraciones de Se en la fracción bioaccesible tras aplicación de la etapa gástrica con distintas concentraciones de pepsina. Valores expresados en mg/Kg ph (media \pm desviación estándar, n=3).

DISCUSIÓN

El pez espada acumula importantes concentraciones de mercurio, principalmente en forma de metilmercurio (Torres Escribano et al., 2010;). Por ese motivo, diferentes organismos relacionados con la seguridad alimentaria y la salud pública recomiendan limitar su consumo en niños de corta edad (entre 1 y 30 meses), mujeres embarazadas o que puedan llegar a estarlo y mujeres en periodo de lactancia (FDA, 2004; FAO/WHO, 2006; AESAN, 2011). Sin embargo, este producto pesquero también es una fuente de Se, elemento traza antagonista del efecto tóxico del Hg. Por este motivo, actualmente se considera que en la evaluación del riesgo asociado al consumo de alimentos con altos contenidos de Hg, debe contemplarse el aporte de Se de esos productos (Raymond y Ralson, 2004).

En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que el 50% de las muestras de pez espada cocinado analizadas superan el límite establecido por la legislación vigente para este pescado fresco [1 mg/Kg ph, Reglamento (CE) No 1881/2006]. El consumo habitual de este pescado (150 g) supondría una ingesta de mercurio entre 35 y 423 μg , que en su totalidad se encontraría como MeHg. La Organización Mundial de la Salud establece una ingesta semanal tolerable (IST) para el MeHg de 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (FAO/WHO/Expert Committee on Food Additives, 2006). Suponiendo un peso corporal medio de 65 Kg para un adulto, la IST no debería exceder los 104 μg de MeHg. El consumo semanal de una ración de la mayoría de las muestras analizadas en el presente estudio, superaría ampliamente esta ingesta recomendada. Este problema se agravaría para la población infantil cuya ingesta semanal de MeHg no debería superar 40 μg .

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo han evidenciado que el pez espada es una fuente importante de selenio. El consumo de las muestras analizadas supondría un aporte de selenio entre 69 y 147 $\mu\text{g}/\text{día}$, que supliría las ingestas diarias recomendadas (55-70 $\mu\text{g}/\text{día}$, OMS 2011). El selenio es un elemento traza esencial, ya que forma parte de numerosos selenoenzimas relacionados con el mantenimiento del balance redox (Ralston et al., 2008; Forceville et al., 2006). Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado su papel protector frente a la aparición de enfermedades tales como la diabetes, patologías cardiovasculares, e incluso procesos cancerígenos (Jerome-Morais et al., 2011). Asimismo, el selenio es conocido como agente que reduce la toxicidad de numerosos xenobióticos como el mercurio. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que la presencia de selenio disminuye el efecto tóxico del mercurio (Raymond y Ralson, 2006). Por este motivo, algunos estudios indican que la relación molar Hg/Se en la dieta es un parámetro más adecuado que las concentraciones individuales de Hg a la hora de hacer estimaciones sobre los riesgos asociados a la exposición (Kaneko y Ralston, 2007). En concreto, se ha puesto de manifiesto que ratios Hg/Se inferiores a la unidad suponen un menor efecto tóxico del Hg (Raymond y Ralson, 2006). En el presente estudio algunas de las muestras que inicialmente sobrepasan el límite legislado y la ingesta recomendada para el Hg, presentan un ratio molar inferior a la unidad y podrían no representar un riesgo.

La evaluación del riesgo asociado a la presencia de contaminantes no suele contemplar las etapas posteriores a la ingesta, las cuales modifican la cantidad de contaminante que llega a circulación sistémica. Entre estos procesos cabe destacar la digestión gastrointestinal, que disgrega la matriz alimentaria y solubiliza el contaminante para su posterior absorción. En el presente trabajo se pone de manifiesto que tras la aplicación de una digestión gastrointestinal *in vitro*, la fracción de Hg solubilizada o bioaccesible no supera, para la mayoría de las muestras, el 50% del contenido inicial en el pez espada. Si utilizan los contenidos solubilizados tras la digestión gastrointestinal (0,21-1,07 mg/kg) para evaluar el riesgo, sólo una de las muestras sobrepasaría la ingesta recomendada. En todas las muestras analizadas, la estimación del riesgo en base al contenido bioaccesible supone una disminución respecto al riesgo estimado en base al contenido en el producto cocinado.

La solubilización de elementos traza depende de numerosos factores: tipo de matriz alimentaria, formas de preparación, forma química del elemento (Moreda Piñeiro, 2011). Se sabe que el Hg y Se se encuentran en las matrices alimentarias unidos principalmente a grupos sulfhidrilo de las proteínas (Ralston et al., 2008). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la solubilización del Se es mayor que la de Hg en un mismo producto pesquero. Esto hace que los contenidos bioaccesibles de selenio superen en la mayoría de los casos a los de mercurio y que por lo tanto el molar ratio Hg/Se de la fracción bioaccesible sea inferior a la unidad. Atendiendo a estos resultados, podemos decir que la cantidad de selenio que podría llegar a la circulación sistémica es mayor a la del mercurio, contrarrestando el efecto tóxico, tal y como indican trabajos previos (Raymond y Ralston., 2006). Sin embargo, teniendo en cuenta la complejidad del proceso absorptivo, son necesarios estudios adicionales que evalúen la cantidad de ambos elementos que llegan al torrente circulatorio, para poder confirmar este punto.

El presente trabajo muestra la importancia de la bioaccesibilidad en la evaluación de la seguridad alimentaria. Sin embargo, la evaluación de este parámetro es un tema en continuo debate. No existe un método universal, y en la mayoría de los casos los métodos empleados no están validados ni suficientemente contrastados. Por otro lado, los modelos estáticos, más empleados por su sencillez, no tienen en cuenta las modificaciones de parámetros del proceso digestivo que ocurren *in vivo* y que podrían ser determinantes. Así, la mayoría de modelos estáticos mantiene el pH cercano a 2 durante todo el período de la etapa gástrica. Sin embargo, tras una ingesta se produce un aumento del pH estomacal, que dependiendo del alimento y el individuo puede llegar a alcanzar valores cercanos a la neutralidad en los primeros momentos, y que posteriormente disminuye hasta los niveles basales (Dressman et al., 1990; Oomen et al., 2002). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la mayor solubilización se produce a pHs ácidos (2-3), coincidiendo con el pH óptimo de la pepsina gástrica. Por tanto, el mantenimiento del pH durante todo el proceso gastrointestinal *in vitro* en valores ácidos favorece la solubilización, especialmente en el caso del Hg, lo que podría conllevar sobreestimaciones de la bioaccesibilidad.

Otro factor importante en el proceso de digestión es la concentración de la pepsina gástrica, especialmente para compuestos con alto contenido proteico

(Kalantzi et al., 2006). La concentración habitual de pepsina en los modelos *in vitro* (0,1-0,2 mg/mL, Oomen et al., 2002; Laparra et al., 2003) es la presente en el estómago en ayunas, pero no representa lo que ocurre tras la ingesta de alimentos. Investigaciones previas indican que el contenido de pepsina tras la ingesta de alimentos oscila entre 0,26-1,0 mg/mL (Kalantzi et al., 2006). Los resultados obtenidos en el presente proyecto muestran que el aumento de la concentración de pepsina en la etapa gástrica favorece la solubilización de Hg, pero no afecta a la bioaccesibilidad del Se. El mantenimiento de la concentración de pepsina en los valores habituales empleados en los modelos estáticos supondría una menor bioaccesibilidad del Hg, y en este caso una subestimación de la cantidad de Hg disponible para la absorción. Estos datos indican la importancia de una adecuada selección del modelo *in vitro* para valorar la bioaccesibilidad. Asimismo ponen de manifiesto que el comportamiento cada elemento en el proceso digestivo es distinto, y que su solubilización no se ve afectada por los mismos factores incluso dentro de una misma matriz alimentaria.

CONCLUSIONES

La estimación del riesgo asociado a la ingesta de Hg y Se a través de los alimentos varía al considerar la bioaccesibilidad en lugar de los contenidos. Esta bioaccesibilidad está afectada por las condiciones de ensayo del modelo gastrointestinal utilizado. La solubilización del mercurio durante la etapa gástrica es altamente dependiente del pH y de la concentración de pepsina, y este contenido solubilizado disminuye significativamente tras la etapa intestinal. El selenio, presenta un comportamiento distinto, ya que su solubilización sólo está afectada por el pH, siendo el efecto de este factor menos destacable que el observado para Hg. Tras la digestión gastrointestinal, la bioaccesibilidad del Hg es inferior a la del Se, observándose una relación molar Hg/Se en la fracción bioaccesible inferior a la unidad en todas las muestras de pez espada analizadas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de investigar en profundidad como la variación que *in vivo* presentan diferentes parámetros de la digestión gastrointestinal puede afectar a la bioaccesibilidad de los elementos traza y en consecuencia a la utilidad de este tipo de estudios *in vitro* para la estimación del riesgo asociado al consumo de ciertos alimentos.

REFERENCIAS

- AESAN. "Recomendaciones de consumo de pescado para poblaciones sensibles debido a la presencia de mercurio, 2011", [en línea]. Dirección URL:<<http://www.aesan.msc.es/>>. [Consulta: 24 Sep. 2012].
- Branco V, Vale C, Canario J, dos Santos MN. Mercury and selenium in blue shark (*Prionace glauca*, L. 1758) and swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) from two areas of the Atlantic Ocean. *Environ Pollut.* 2007;150(3):373-80.
- Burger J, Gochfeld M. Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season. *Sci Total Environ.* 2011;409(8):1418-29.

- Cabanero AI, Carvalho C, Madrid Y, Batoreu C, Camara C. Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biol Trace Elem Res.* 2005;103(1):17-35.
- Cabanero AI, Madrid Y, Camara C. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal Chim Acta.* 2004;526(1):51-61.
- Cabanero AI, Madrid Y, Camara C. Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. *Biol Trace Elem Res.* 2007;119(3):195-211.
- Calatayud M, Devesa V, Virseda JR, Barbera R, Montoro R, Velez D. Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(8):2696-702. Epub 2012/05/29.
- Dressman JB, Berardi RR, Dermentzoglou LC, Russell TL, Schmaltz SP, Barnett JL, Jarvenpaa KM. Upper gastrointestinal (Gi) pH in young, healthy-men and women. *Pharm Res.* 1990;7(7):756-61.
- Endo T, Haraguchi K, Sakata M. Mercury and selenium concentrations in the internal organs of toothed whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. *Sci Total Environ.* 2002;300(1-3):15-22.
- FAO/WHO/Expert Committee on Food Additives. "Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 2006", [en línea]. Dirección URL: <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. [Consulta: 24 Sep. 2012].
- FDA. U.S Food and Drug Administration. "What you need know about mercury in fish and shellfish, 2004", [en línea]. Dirección URL: <<http://www.fda.gov>>. [Consulta: 26 Sep. 2012].
- Forceville X. Seleno-enzymes and seleno-compounds: the two faces of selenium. *Crit Care.* 2006;10(6):180. Epub 2006/12/23.
- Grandjean P, Herz KT. Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *The Mount Sinai journal of medicine, New York.* 2011;78(1):107-18. Epub 2011/01/25.
- Grandjean P, Satoh H, Murata K, Eto K. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ Health Perspect.* 2010;118(8):1137-45. Epub 2010/06/10.
- He M, Wang WX. Factors affecting the bioaccessibility of methylmercury in several marine fish Species. *J Agr Food Chem.* 2011;59(13):7155-62.
- IARC. Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer. "Grupo 2B", [en línea]. Volumen 58 (1993) Dirección URL:<<http://www.iarc.fr/>>. [Consulta: 17 Sep. 2012].
- Jaiswal SK, Prakash R, Acharya R, Nathaniel TN, Reddy AVR, Prakash NT. Bioaccessibility of selenium from Se-rich food grains of the seleniferous region of Punjab, India as analyzed by instrumental neutron activation analysis. *Cyta-J Food.* 2012;10(2):160-4.
- Jerome-Morais A, Diamond AM, Wright ME. Dietary supplements and human health: for better or for worse? *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(1):122-35. Epub 2011/01/06.
- Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res.* 2006;23(1):165-76.
- Kaneko JJ, Ralston NVC. Selenium and mercury in pelagic fish in the central north pacific near Hawaii. *Biol Trace Elem Res.* 2007;119(3):242-54.
- Laparra JM, Velez D, Montoro R, Barbera R, Farre R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J Agr Food Chem.* 2003;51(20):6080-5.
- Moreda-Pineiro J, Moreda-Pineiro A, Romaris-Hortas V, Moscoso-Perez C, Lopez-Mahia P, Muniategui-Lorenzo S, et al. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *Trac-Trend Anal Chem.* 2011;30(2):324-45.
- Newland MC, Reed MN, LeBlanc A, Donlin WD. Brain and blood mercury and selenium after chronic and developmental exposure to methylmercury. *Neurotoxicology.* 2006;27(5):710-20.
- OMS. Selenium in Drinking Water. 2011. [en línea]. Dirección URL: < <http://www.who.int/en>>. [Consulta: 24 Sep. 2012].
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G, et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ Sci Technol.* 2002;36(15):3326-34.

- Plessi M, Bertelli D, Monzani A. Mercury and selenium content in selected seafood. *J Food Compos Anal.* 2001;14(5):461-7.
- Poulin y Gibb. "Mercury. Assessing the environmental burden of disease at national and local levels, 2008", [en línea]. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Dirección URL: <<http://www.who.int/en/>>. [Consulta: 18 Sep. 2012].
- Ralston NVC. Selenium health benefit values as seafood safety criteria. *Ecohealth.* 2008;5(4):442-55.
- Raymond LJ, Ralston NVC. Selenium prevents and reverses methylmercury toxicity. *Neurotoxicology.* 2006;27(6):1172-3.
- Reglamento CE No 1881/2006. [en línea]. Diario Oficial de la Unión Europea. Dirección URL: <<http://eur-lex.europa.eu/>>. [Consulta: 21 Sep. 2012].
- SANCO. "Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States, 2004", [en línea]. Dirección URL: <<http://ec.europa.eu/>>. [Consulta: 17 Sep. 2012].
- Shim SM, Ferruzzi MG, Kim YC, Janle EM, Santerre CR. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chem.* 2009;112(1):46-50.
- Torres-Escribano S, Ruiz A, Barrios L, Velez D, Montoro R. Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *J Sci Food Agr.* 2011;91(6):981-6.
- Torres-Escribano S, Velez D, Montoro R. Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Addit Contam A.* 2010;27(3):327-37.
- Yamashita Y, Amlund H, Suzuki T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K, Yamashita M. Selenoneine, total selenium, and total mercury content in the muscle of fishes. *Fisheries Sci.* 2011;77(4):679-86.