



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# REDUCCIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO MEDIANTE ESTRATEGIAS DIETÉTICAS

**Máster en Ciencia e Ingeniería de los  
Alimentos**

Presentado por:  
**Virginia Sánchez Jiménez**

Directores:  
**Dinoraz Vélez Pacios**  
**Vicenta Devesa Pérez**

Tutor:  
**José Javier Benedito Fort**

Valencia, Julio, 2015

# REDUCCIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO EMPLEANDO ESTRATEGIAS DIETÉTICAS

Sánchez-Jiménez, V<sup>1</sup>., Jadán, C<sup>2</sup>., Vélez, D<sup>2</sup>, Devesa, V<sup>2</sup>

## RESUMEN

Los alimentos son la principal fuente de exposición al mercurio. El consumo de pescado, especialmente de grandes depredadores marinos, aporta cantidades de metilmercurio (CH<sub>3</sub>Hg) consideradas de riesgo para ciertos grupos poblacionales. Para ejercer su efecto tóxico, el mercurio ingerido con los alimentos debe ser solubilizado durante la digestión y absorbido a través del epitelio gastrointestinal. El presente trabajo estudia la capacidad de ciertos componentes o aditivos alimentarios para disminuir la cantidad de mercurio soluble tras la digestión gastrointestinal (bioaccesibilidad).

Inicialmente se ha evaluado el efecto de 29 componentes o aditivos sobre la solubilidad de patrones acuosos de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg sometidos a las condiciones de digestión gastrointestinal. Aquellos que han producido una disminución significativa de la solubilidad de ambas especies de mercurio, han sido ensayados en alimentos, concretamente en muestras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), con el fin de disminuir la cantidad de mercurio soluble tras la digestión de esta matriz alimentaria. Los resultados obtenidos evidencian que algunos compuestos disminuyen de forma muy significativa la bioaccesibilidad de mercurio desde el alimento (lignina: 64-98%, ácido tánico: 58-78%, hidroxipropilmetilcelulosa: 35-73%, pectina: 30-66%, metilcelulosa: 39-54%, carboximetilcelulosa: 19-42%). En general, estos compuestos no afectan a la bioaccesibilidad de elementos traza esenciales (Ca, Mg, K, Fe y P) ni de las proteínas de la matriz alimentaria estudiada y por tanto, no afectan al valor nutricional del alimento. Los resultados obtenidos apuntan a estos compuestos como buenas estrategias dietéticas para reducir el efecto de la exposición oral a mercurio.

**PALABRAS CLAVE:** bioaccesibilidad, mercurio, componentes dietarios, atún.

## ABSTRACT

Food is the main source of human exposure to mercury. Fish consumption, especially marine large predators, provide high amounts of methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg), which can represent a risk for certain population groups. To exert its toxic effect, mercury ingested with food must be solubilized during digestion and absorbed through the gastrointestinal

<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia, Caminon de Vera s/n 46022. Valencia. España.

<sup>2</sup>Laboratorio Elementos Traza, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, Científicas (IATA-CSIC). Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, España.

epithelium. This paper studies the ability of certain food components or additives to reduce amount of soluble mercury after the gastrointestinal digestion (bioaccessibility).

Initially the effect of 29 components or additives on the solubility of aqueous standards of Hg(II) and CH<sub>3</sub>Hg subject to the conditions of gastrointestinal digestion has been evaluated. Those compounds that have decreased the solubility of both mercury species, have been tested in samples of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), in order to decrease the amount of soluble mercury after the digestion of this food matrix. The results show that some of these compounds reduce the bioaccessibility of Hg (tannic acid: 58-78%; pectin: 30-66%, carboxymethyl cellulose: 19-42%, hydroxypropyl methylcellulose: 37-73%, methylcellulose: 39-54%, lignin: 64-98%). These compounds do not affect the bioaccessibility of essential trace elements (Ca, Mg, K, Fe and P) or proteins and therefore they do not affect the nutritional value of this food product. The results point to these compounds as good dietary strategies to reduce oral exposure to mercury

**KEYWORDS:** bioaccessibility, mercury, dietary components, tuna.

## RESUM

Els aliments són la principal font d'exposició humana al mercuri. El consum de peix, especialment de grans depredadors marins, aporta quantitats de metilmercuri (CH<sub>3</sub>Hg) considerades de risc per a certs grups poblacionals. Per exercir el seu efecte tòxic, el mercuri ingerit amb els aliments ha de ser solubilitzat durant la digestió i absorbit a través de l'epiteli gastrointestinal. El present treball estudia la capacitat de certs components o additius alimentaris per disminuir la quantitat de mercuri soluble després de la digestió gastrointestinal (bioaccessibilitat).

Inicialment s'ha avaluat l'efecte de 29 components o additius sobre la solubilitat de patrons aquosos de Hg(II) i CH<sub>3</sub>Hg sotmesos a les condicions de digestió gastrointestinal. Aquells que han produït una disminució significativa de la solubilitat d'ambdues espècies de mercuri, han estat assajats en aliments, concretament en mostres de tonyina d'aleta groga (*Thunnus albacares*), amb la finalitat de disminuir la quantitat de mercuri soluble després de la digestió d'aquesta matriu alimentària. Els resultats obtinguts evidencien que alguns compostos disminueixen de forma molt significativa la bioaccessibilitat de mercuri des de l'aliment (lignina: 64-98%, àcid tànic: 58-78%, hidroxipropilmetil cel.lulosa: 35-73%, pectina: 30-66%, metilcel.lulosa: 39-54%, carboximetil cel.lulosa: 19-42%). Aquests compostos no afecten a la bioaccessibilitat d'elements traça essencials (Ca, Mg, K, Fe i P) ni de les proteïnes de la matriu alimentària estudiada i per tant, no afecten el valor nutricional de l'aliment. Els resultats obtinguts apunten a aquests compostos com a bones estratègies dietètiques per reduir l'exposició oral a mercuri.

**PARAULES CLAU:** bioaccessibilitat, mercuri, components dietètics, tonyina.

## 1. INTRODUCCIÓN

El mercurio (Hg) es uno de los contaminantes con mayor distribución en la naturaleza. El agua, el aire y los alimentos son las principales fuentes de exposición. Las formas mercuriales mayoritarias en la dieta son el mercurio inorgánico divalente [Hg(II)] y el metilmercurio (CH<sub>3</sub>Hg). Los productos de la pesca, especialmente los grandes depredadores, son las principales fuentes dietarias de CH<sub>3</sub>Hg, aunque también presentan concentraciones relevantes de Hg(II) (EFSA, 2012). Algunos productos vegetales como las setas también contribuyen a la exposición dietaria de Hg(II) (Kalac y Svoboda, 2000).

Los principales efectos de la exposición a Hg se manifiestan a nivel neurológico, inmunológico, hematológico y renal (NTP, 1993). Esta toxicidad depende de la dosis, la forma química y la ruta de exposición. Teniendo en cuenta el carácter neurotóxico y la transmisión fetal, especialmente del CH<sub>3</sub>Hg, se consideran grupos poblacionales de riesgo las mujeres embarazadas y los niños. Por ello, algunas organizaciones responsables de la seguridad alimentaria y la salud han emitido recomendaciones para limitar o reducir el consumo de determinados productos pesqueros en estos grupos vulnerables (FSA, 2003; USEPA, 2004; Health Canada, 2008).

El hecho de que muchas de las matrices alimentarias con elevados contenidos en Hg sean importantes fuentes de nutrientes y compuestos con alto valor biológico, y que en algunos casos constituyan la base de la dieta local, hacen difícil la reducción de su consumo. Como alternativa para disminuir la exposición al tóxico se ha intentado reducir los contenidos de este metal en los alimentos antes de su comercialización, tratando los productos pesqueros con sustancias quelantes, cisteína, NaCl y EDTA (Hajeb y Jinap, 2012). Algunos de estos enfoques han tenido éxito a nivel de laboratorio, pero no se han extrapolado a la industria, posiblemente debido a dificultades técnicas o a cambios organolépticos, estructurales o nutricionales del producto alimenticio.

Otra posible forma de intervención para reducir el efecto de la exposición oral a un tóxico alimentario, consiste en actuar después de la ingesta del alimento, reduciendo su absorción. Durante la digestión gastrointestinal, el alimento sufre una serie de procesos físicos y químicos que permiten la solubilización de sus componentes. El Hg liberado de la matriz puede unirse a otros componentes alimentarios presentes en el lumen formando complejos con características diferentes a las del Hg presente inicialmente en el alimento, hecho que va a afectar su llegada a la circulación sistémica. Se ha descrito que la biodisponibilidad oral de Hg, es decir, la fracción del metal que alcanza el torrente sanguíneo tras la ingesta, se ve influenciada por la presencia de determinados componentes alimentarios. Janle et al. (2015) muestran que el Hg presente en pez espada es absorbido con más eficacia en ratas cuando se administra simultáneamente con extracto de té verde. Este mismo efecto se ha observado en humanos alimentados con dos comidas de pescado y 6 tazas de té al día durante 3 días consecutivos

(Canuel et al., 2006). Por el contrario, la presencia de fibras insolubles reduce *in vivo* la absorción de CH<sub>3</sub>Hg (Rowland et., 1986). Por tanto, existen componentes en la dieta que aumentan o reducen la cantidad de Hg que, tras la ingesta de alimentos, llega a la circulación sistémica y se acumula en los órganos diana. Este hecho permite valorar la posible utilización de componentes alimentarios como estrategias dietéticas para reducir la llegada de este metal al torrente sanguíneo. Una forma de actuar para conseguir este objetivo es reducir la fracción de mercurio que queda soluble tras la digestión en el tracto gastrointestinal y que está disponible para su absorción, es decir, reducir la bioaccesibilidad.

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de componentes de los alimentos o aditivos alimentarios que reduzcan la bioaccesibilidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg de los alimentos, con el fin de disminuir la cantidad de Hg disponible para la absorción intestinal. Para este propósito, se ha ensayado el efecto de 29 compuestos sobre la cantidad de Hg soluble tras la digestión gastrointestinal de disoluciones acuosas de las formas mercuriales y de atún, matriz con altos niveles de Hg.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Muestras y componentes dietarios o aditivos.**

Se compraron muestras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) en diferentes supermercados de la ciudad de Valencia (España). Todas las muestras fueron cocinadas a la plancha sin adición de otros ingredientes. Posteriormente fueron trituradas, homogeneizadas y conservadas a 4°C hasta su análisis.

Los componentes o aditivos alimentarios (n=29) ensayados se describen en la tabla 1. Las concentraciones de cada uno de los compuestos fueron seleccionadas atendiendo a sus concentraciones habituales en alimentos o a las cantidades normalmente adicionadas a los mismos.

**TABLA 1.** Componentes o aditivos alimentarios y concentraciones utilizadas en los ensayos de solubilidad en disolución acuosa de patrones y de bioaccesibilidad desde la matriz alimentaria. Concentraciones expresadas en g/100 mL.

Componentes o aditivos dietéticos	Concentración (patrón acuoso Hg)	Concentración (matriz alimentaria)	Marca
L- Cisteína	0.5	ne	Merck
Sal dipotásica de ácido fítico	0.5	ne	Sigma-Aldrich
Sales de CaCl <sub>2</sub> anhidrido/ Sal dipotásica de ácido fítico	0.55/0.11	ne	Panreac/ Sigma-Aldrich
Pectina (manzana)	1.0	1.0/2.0	Sigma
Hidrato de catequina	0.04	ne	Fluka
Ácido tánico	3.2	0.5/1.0	Merck
Ácido málico	0.8	ne	Sigma-Aldrich
Ácido oxálico dihidrato	0.12	ne	Merck
Ácido cítrico 1-hidrato	0.04	ne	Panreac
Saponina	2.0	1.0/3.0	Santa Cruz Biotech.
Xilano (piel de avena)	1.4	1.5/3.0	Sigma
Lignina alcalina	1.4	0.5/1.5	Aldrich
Sulfato de hierro(II) heptahidratado [Fe(II)]	0.048	ne	Sigma-Aldrich
Sulfato de hierro(III) hidratado [Fe(III)]	0.048	ne	Scharlau
Seleno-D-L-metionina (SeMet)	0.1 × 10 <sup>-3</sup>	na	Sigma
Selenato de sodio [Se(VI)]	0.1 × 10 <sup>-3</sup>	ne	Merck
Carboximetilcelulosa (CMC)	0.20	0.20/0.40	AKUCCELL
Hidroximetilcelulosa (HPMC)	1.6	1.6/3.2	Dow Chemical
Metilcelulosa (MC)	1.0	0.5/1.0	Dow Chemical
Hidroxipropilcelulosa (HPC)	0.4	0.5/2.0	Aldrich
Alginato de sodio	0.2	ne	EPSA
λ carragenano	0.2	ne	Cargill
Gelatina (piel de cerdo)	0.2	ne	Sigma
Goma xantana ( <i>Xanthomonas campestris</i> )	1.0	ne	Sigma
Goma guar	1.0	ne	Fluka
Goma arábiga (acacia)	1.0	1.0/3.0	Fluka
(±)-α-ácido lipoico	0.02	0.02/0.1	Sigma
Qutosano densidad media	0.48	0.5/1.0	Aldrich
N-acetilcisteína (NAC)	0.40	ne	Sigma

na: no ensayado.

## 2.2. Estudio de la influencia de componentes o aditivos alimentarios. Digestión gastrointestinal *in vitro*.

La evaluación del efecto de los componentes alimentarios se llevó a cabo mediante dos aproximaciones. Se analizó el efecto de los compuestos sobre la solubilidad de las formas mercuriales, empleando disoluciones acuosas de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (ambas a 1 mg/L) preparadas a partir de patrones comerciales de Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1000 mg/L, Merck, España) y CH<sub>3</sub>HgCl (1000 mg/L, Alfa Aesar, España), respectivamente.

Estas disoluciones patrón de Hg se pusieron en contacto durante 30 minutos con los componentes y aditivos alimentarios y posteriormente el conjunto se sometió a una digestión gastrointestinal. Aquellos compuestos que redujeron en un 25% la solubilidad de las especies de Hg tras la digestión gastrointestinal, fueron ensayados en las muestras de atún cocinado. Para tal fin, a las muestras cocinadas se les adicionó la cantidad correspondiente de los compuestos (tabla 1) y el conjunto se sometió a la digestión *in vitro*.

Para la digestión gastrointestinal se aplicó el método descrito por Laparra et al. (2003) (figura 1). Las enzimas y sales biliares que se utilizaron durante la digestión gastrointestinal *in vitro* fueron: pepsina porcina (actividad de la enzima 944/mg de proteína, Sigma-Aldrich, España), pancreatina porcina (actividad equivalente a 4 × US especificaciones Pharmacopea/mg de pancreatina, Sigma) y sales biliares (mezcla de colato de sodio y desoxicolato de sodio, Sigma). A partir de estas disoluciones comerciales se prepararon las disoluciones de trabajo: pepsina 0,1 g/mL en 0,1 mol/L HCl; pancreatina 0,004 g/mL y sales biliares 0,025 g/mL en 0,1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>.

El alimento cocinado (10 g) o la disolución patrón (25 mL), con o sin la correspondiente cantidad de los compuestos a ensayar, se pesó en un erlenmeyer y se añadieron 85 g de agua desionizada, ajustando el pH a 2 con HCl 6 mol/L. Posteriormente se añadió un volumen de la disolución de pepsina para obtener 0,002 g de pepsina/g de muestra. La mezcla se llevó hasta un peso de 100 g con agua desionizada y se incubó a 37 °C durante 2 h con agitación constante (120 rpm/min).

El digerido gástrico se sometió a las condiciones de digestión intestinal, aumentando el pH a 6,5 con NaHCO<sub>3</sub> 1 mol/L y añadiendo un volumen de la disolución de pancreatina y sales biliares para obtener una concentración final de 0,00025 g de pancreatina y 0,0015 g de sales biliares por gramo de muestra. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 h con agitación constante (120 rpm/min).

Finalizada la digestión, las muestras se centrifugaron (10000 rpm, 4°C, 30 min) y se procedió a la determinación de Hg en la fracción soluble obtenida (fracción bioaccesible). La bioaccesibilidad se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad} = [A/B] \times 100$$

donde: A = concentración de Hg bioaccesible (fracción soluble) después de la aplicación de la digestión simulada (mg/kg peso húmedo) y B = concentración de Hg en el alimento cocinado o en la disolución patrón (mg/kg peso húmedo).

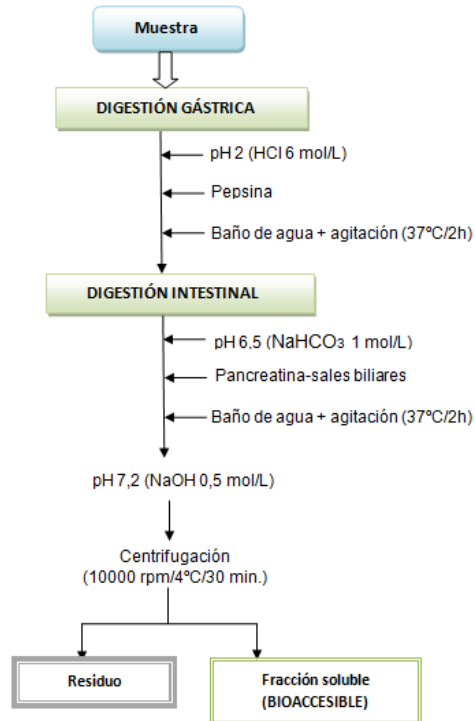


FIGURA 1. Esquema del modelo gastrointestinal *in vitro*.

### 2.3. Determinación de Hg.

Las muestras fueron digeridas mediante un sistema de reacción de microondas acelerada (MARS, CEM, Vertex, España) para posteriormente cuantificar el Hg por generación de vapor en frío acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica, CV-AFS (Millennium Merlin PSA 75 10.025, PS Analítica, Reino Unido).

Las muestras de atún cocinado (0,2 g) y las fracciones solubles procedentes de la digestión gastrointestinal (4 mL) se colocaron en reactores de teflón y se adicionaron 4 mL de HNO<sub>3</sub> 14 mol/L (Merck) y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v, Prolabo, España). Se aplicó un ciclo de digestión por microondas (800 W, 180°C, 15 min) y el producto obtenido tras la digestión se dejó en reposo durante 12 h para eliminar los vapores nitrosos. Posteriormente se llevó a un volumen de 14 mL con HCl 0,6 mol/L y el Hg se cuantificó por CV-AFS. Las condiciones instrumentales utilizadas se muestran en la tabla 2.

El control de calidad de la cuantificación de la CV-AFS se realizó mediante el análisis de una muestra líquida de referencia (QCI-049-1 traza



Metales AA Muestra 1, LGC Standards, España) con una concentración certificada de Hg de  $40,8 \pm 1,19$  mg/L. El control de calidad para el método analítico completo (digestión por microondas y cuantificación) se realizó a través del análisis de una muestra de referencia de proteína de pescado (DORM-3, NRCC, Canadá) con una concentración certificada de Hg de  $0,382 \pm 0,06$  mg/kg. Ambas muestras certificadas se analizaron con cada lote de muestras.

**TABLA 2.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Hg mediante CV-AFS.

<b>Agente reductor</b>	SnCl <sub>2</sub> 2% (m/v) (Scharlab, España) en HCl 1,8 mol/L (Merck). Flujo 1,5 mL/min.
<b>Blanco de reactivo</b>	HCl 0.6 mol/L. Flujo 9 mL/min
<b>Gas portador</b>	Argón. Flujo 0.3 L/min
<b>Gas de secado</b>	Aire. Flujo 2.5 L/min
<b>Tiempo de retardo</b>	15 s
<b>Tiempo de análisis</b>	40 s
<b>Tiempo de lavado</b>	60 s

#### **2.4. Determinación de Ca, Mg, K, Fe y P en las fracciones bioaccesibles.**

Las fracciones solubles procedentes de la digestión gastrointestinal fueron tratadas siguiendo el protocolo descrito para la determinación de Hg. El producto obtenido tras la digestión en microondas se llevó a un volumen de 14 mL con agua desionizada. Se cuantificaron los contenidos de Ca, Mg, K, Fe y P por espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (modelo 4300 DV, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

#### **2.5. Determinación del contenido proteico en las fracciones bioaccesibles.**

Para la cuantificación del contenido total de proteínas se empleó el método Bradford utilizando el kit de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratorios, USA) y albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) como estándar para la calibración. Las determinaciones se llevaron a cabo por mediciones de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm mediante un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA (BMG-Labtech, Alemania).

#### **2.6. Análisis Estadístico.**

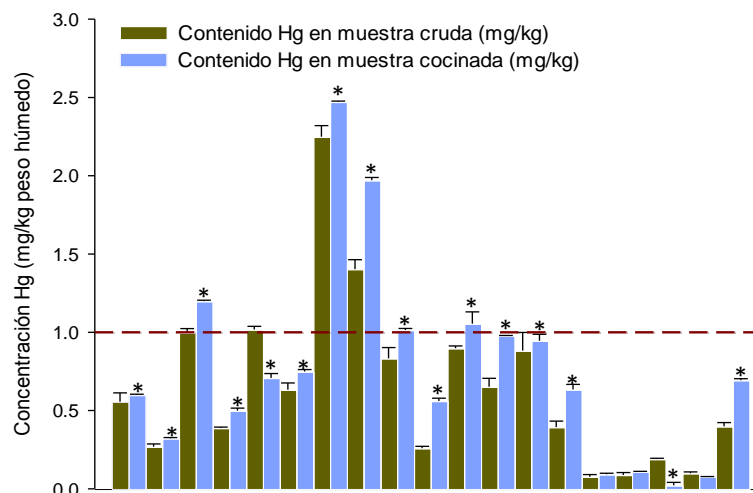
El análisis estadístico se realizó, dependiendo del ensayo, aplicando la prueba t-student para datos pareados o no pareados o por medio de un

análisis de la varianza con un sólo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Tukey HSD (SigmaPlot, versión 12). Las diferencias se consideraron significativas para  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efecto del cocinado sobre el contenido de mercurio y determinación de la bioaccesibilidad de Hg en muestras de atún.

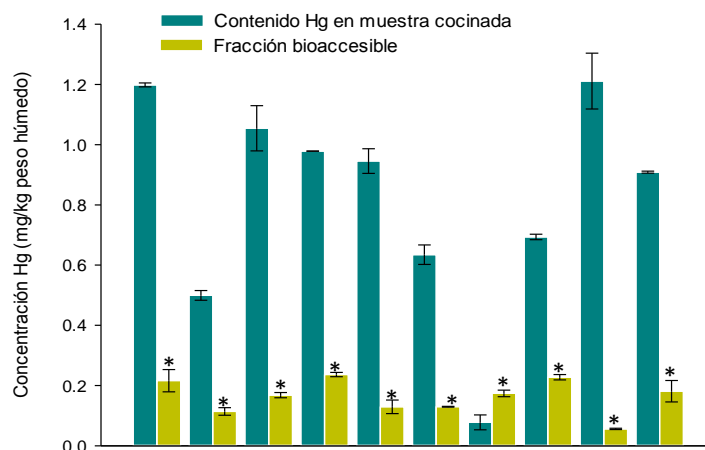
La figura 2 muestra el contenido de Hg (mg/kg peso húmedo) en muestras de atún. Los contenidos oscilan entre 0,07-2,25 mg/kg en muestras crudas y 0,02-2,47 mg/kg en atún cocinado. Con excepción de tres muestras, los contenidos en las muestras de atún cocinadas son significativamente superiores a los hallados en la misma muestra cruda. El incremento es moderado (mediana: 0,169; rango: 0,0155-0,567) y puede atribuirse a la pérdida de agua que se produce durante el tratamiento culinario. Además, cabe destacar que de las muestras crudas analizadas, un 26% de supera el límite de Hg permitido por la legislación vigente en España para esta especie de pescado (1 mg/kg, Reglamento CE No 1881/2006).



**FIGURA 2.** Contenido de Hg en muestras de atún crudas (verde) y cocinadas (azul). Valores expresados en mg/kg peso húmedo (media  $\pm$  SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas de los contenidos de Hg en muestras cocinadas respecto a los contenidos en la misma muestra cruda ( $p < 0,05$ ).

Dado que este pescado es consumido habitualmente por la población española tras ser cocinado, han sido estas las muestras utilizadas para estudiar la bioaccesibilidad de Hg. La figura 3 muestra el contenido de Hg en el atún cocinado y en la fracción bioaccesible obtenida tras la aplicación de la digestión gastrointestinal. El Hg en la fracción bioaccesible oscila entre

0,05-0,24 mg/kg, siendo la bioaccesibilidad muy variable (9-47%; mediana: 24%).

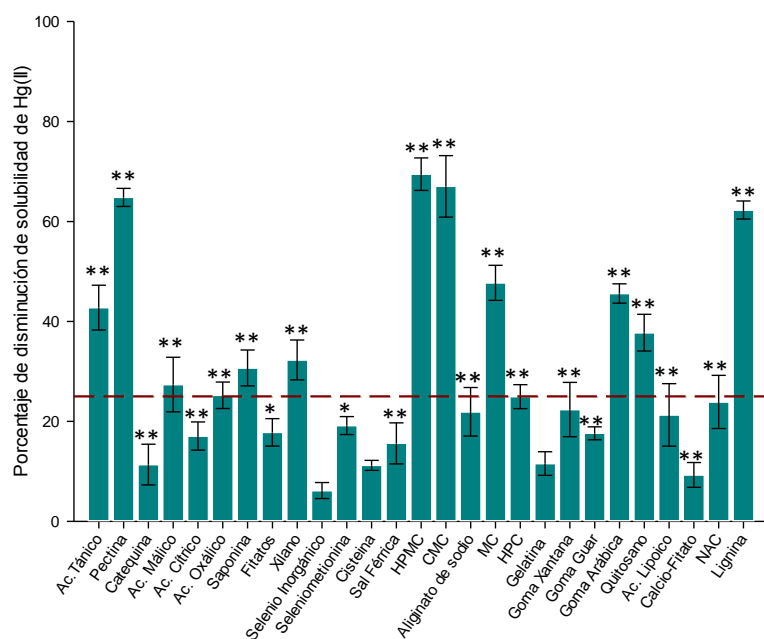


**FIGURA 3.** Contenido de Hg en muestras de atún cocinadas (verde) y en la fracción bioaccesible de muestras de atún cocinadas (amarillo). Valores expresados en mg/kg peso húmedo (media  $\pm$  SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas de los contenidos de Hg en las fracciones bioaccesibles respecto a los contenidos en la muestra cocinada ( $p < 0,001$ ).

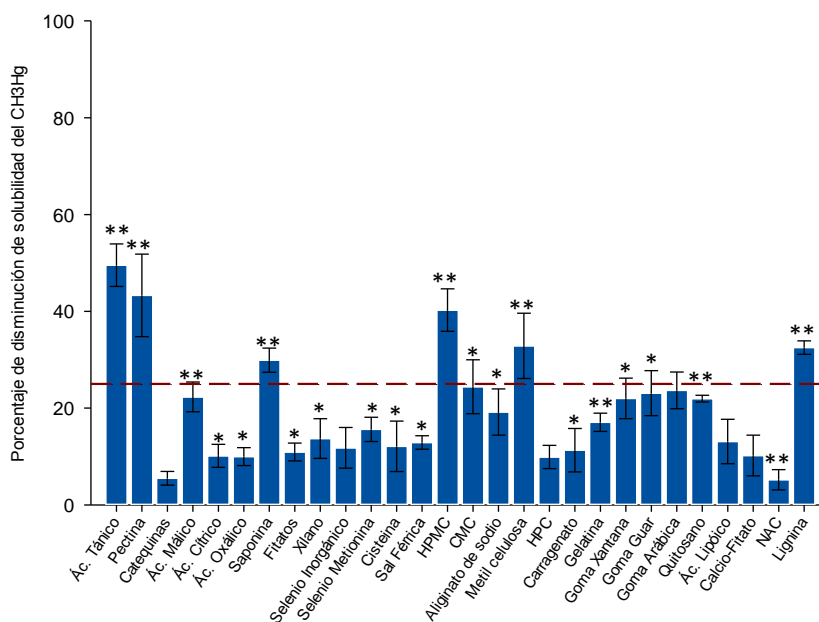
### 3.2. Efecto de los componentes o aditivos alimentarios sobre la solubilidad de Hg en patrones acuosos de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

La mayor parte de los componentes o aditivos ensayados producen una disminución significativa en la solubilidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en patrones acuosos durante la digestión gastrointestinal, tal y como muestran las figuras 4 y 5. El descenso se pone de manifiesto para ambas especies de mercurio y tanto en la etapa gástrica como en la etapa intestinal de la digestión. Son destacables las reducciones producidas para el Hg(II) por la HPMC (69,5  $\pm$  3,2%), CMC (67,0  $\pm$  6,2%), pectina (64,8  $\pm$  1,8%), lignina (62,3  $\pm$  1,8%), MC (47,7  $\pm$  3,5%), goma arábica (45,6  $\pm$  1,9%), ácido tánico (42,8  $\pm$  4,5%) y quitosano (37,8  $\pm$  3,7%). La solubilidad de CH<sub>3</sub>Hg se reduce en menor magnitud que la de Hg(II), siendo notable el efecto del ácido tánico (49,5  $\pm$  4,4%), pectina (43,3  $\pm$  8,5%), HPMC (40,3  $\pm$  4,4%) y MC (32,9  $\pm$  6,8%).

Los componentes capaces de reducir la solubilidad de alguna de las especies mercuriales al menos en un 25% (ácido tánico, pectina, MC, CMC, HPMC, HPC, saponina, lignina, goma arábica, ácido lipoico, xilano y quitosano) han sido ensayados en las muestras de atún cocinado.



**FIGURA 4.** Porcentaje de reducción de la solubilidad de Hg(II) (1 mg/L) tras la digestión gastrointestinal en presencia de componentes o aditivos alimentarios. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=4). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la disolución estándar sin componentes o aditivos (\*\*,  $p < 0,001$ ; \*,  $p < 0,05$ ).

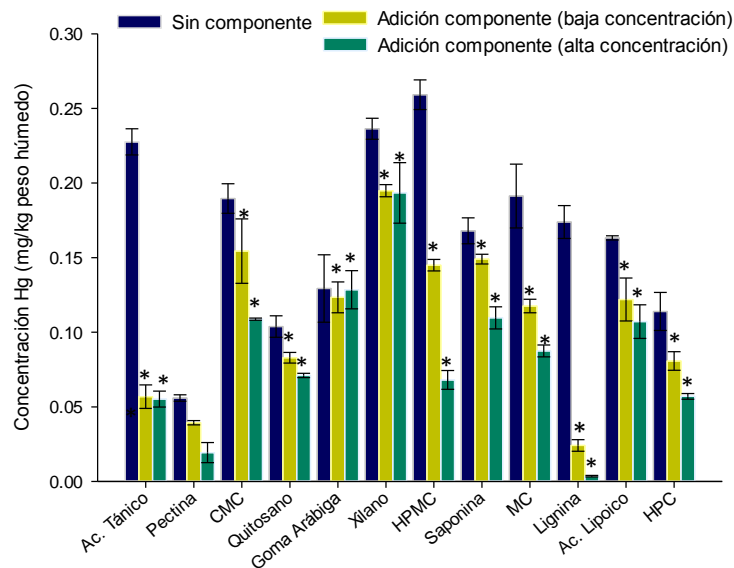


**FIGURA 5.** Porcentaje de reducción de la solubilidad de CH<sub>3</sub>Hg (1 mg/L) tras la digestión gastrointestinal en presencia de componentes o aditivos alimentarios. Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=4). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la disolución estándar sin componentes o aditivos (\*\*,  $p < 0,001$ ; \*,  $p < 0,05$ ).

### 3.3. Efectos de componentes o aditivos alimentarios en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de atún.

La figura 6 muestra las variaciones de bioaccesibilidad de Hg de muestras de atún en presencia de los componentes seleccionados, cada uno de ellos ensayados a dos concentraciones. Con excepción de la goma arábica, el resto de componentes reducen significativamente la bioaccesibilidad. Por otra parte el aumento de la concentración del componente conlleva, en la mayoría de los casos, una reducción en la bioaccesibilidad del Hg.

Los componentes que reducen la bioaccesibilidad de forma más notable son lignina (65-95%), ácido tánico (59-78%), HPMC (34-73%), pectina (30-66%), MC (39-54%) y CMC (19-43%). Las reducciones son menores, aunque también significativas, para la saponina (11-35%), ácido lipico (25-34%), quitosano de densidad media (20-32%) y xilano (16-18%).



**FIGURA 6.** Efecto en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de atún de los componentes o aditivos alimentarios [sin adición (azul), con adición del componente o aditivo a la baja concentración (amarillo) y con adición de la alta concentración (verde)]. Valores expresados en mg/kg peso húmedo (media  $\pm$  SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias significativas de la bioaccesibilidad de Hg en muestras de atún en presencia del componente o aditivo frente a la bioaccesibilidad de Hg sin adición del mismo ( $p < 0,001$ ).

### 3.4. Efectos de los componentes dietéticos o aditivos sobre la bioaccesibilidad de minerales (Ca, Mg, K, Fe y P) y proteínas en muestras de atún.

Para los compuestos que han sido eficaces en la reducción de la bioaccesibilidad de Hg desde las matrices alimentarias, se ha estudiado su

efecto sobre la bioaccesibilidad de otros elementos traza esenciales y de proteínas, con el fin de buscar estrategias dietarias que no conlleven reducciones del valor nutricional de estos alimentos.

En la Tabla 3 se muestra el efecto de estos componentes o aditivos sobre la bioaccesibilidad de minerales (Ca, Mg, K, Fe y P) y proteínas desde muestras de atún. La mayoría de componentes ensayados no reducen de forma relevante los contenidos de los minerales en la fracción soluble obtenida tras la digestión, excepto la lignina y la pectina, que reducen el Fe. En algunos casos se observan importantes incrementos del contenido de estos minerales que pueden ser atribuidos a su presencia en la sustancia adicionada.

En cuanto al contenido proteico, los datos muestran que no se producen en general reducciones; incluso se observan incrementos del mismo. Hay que indicar que el método Bradford permite la detección de proteínas con un tamaño mayor a 5 kD. El modelo de digestión *in vitro* aplicado contiene proteasas que posiblemente rompan las proteínas existentes en el alimento dando lugar a fragmentos inferiores a 5kD, no detectables por esta técnica. Es posible que en presencia de algunos de estos componentes, la actividad peptídica se modifique y se produzca una menor fragmentación de las proteínas y por tanto aparezcan un mayor número de fragmentos proteicos mayores a 5kD. Éste podría ser en parte el motivo del mayor contenido proteico observado en presencia de algunos de estos componentes aplicando el método Bradford (tabla 3). Por tanto, para mostrar el efecto real de la adición de estos componentes sobre el contenido proteico en la fracción soluble sería, necesario realizar un ensayo cuantitativo basado en técnicas electroforéticas.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, se puede concluir que en líneas generales, los compuestos seleccionados como estrategias dietéticas no conllevan una modificación de los nutrientes disponibles para su posterior absorción intestinal.

**TABLA 3.** Porcentaje de modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe, P y proteínas en muestras cocinadas tras aplicar una digestión gastrointestinal en presencia de componentes o aditivos alimentarios (n=2).

Componente alimentario	Ca	Mg	K	Fe	P	Proteínas
Ácido Tánico	285,5%	43,5%	25,5%	376,7%	32,0%	297,7%
CMC	249,0%	29,3%	-10,0%	-13,7%	-4,6%	127,1%
HPMC	16,2%	-1,6%	0,2%	-5,7 %	-3,3%	32.1%
Lignina	-4,4 %	0,46%	-17,8%	-59,1%	1,8 %	57,6%
Pectina	- 3,2 %	-15,5%	-13,3%	-66,9%	48,0 %	190,0%

#### 4. DISCUSIÓN

La absorción intestinal de Hg depende de la forma química, la dosis y la vía de exposición. Estudios llevados a cabo *in vitro* muestran que en los productos pesqueros la cantidad de Hg que tras la digestión gastrointestinal es extraído de la matriz y puesto en disolución y, por tanto disponible para su posterior absorción (bioaccesibilidad), es muy variable. Los porcentajes de bioaccesibilidad oscilan entre un 9-85% con respecto al contenido total en el producto crudo (Cabañero et al., 2004; Torres-Escribano et al., 2011). Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que la bioaccesibilidad de Hg se reduce considerablemente cuando el producto pesquero es sometido a un proceso culinario (6-49%) (Torres-Escribano et al., 2011). En el presente trabajo se obtienen bioaccesibilidades de Hg tras el cocinado del atún que oscilan entre 9 y 47%, similares a las encontradas en otros estudios para productos pesqueros cocinados. Teniendo en cuenta dicha fracción bioaccesible, el consumo de una ración (150 g) a la semana puede suponer una ingesta de Hg (56-245  $\mu\text{g}$ /semana), que en algunos casos supera la Ingesta Semanal de  $\text{CH}_3\text{Hg}$  recomendada por la FAO/OMS (1,6  $\mu\text{g}$ /kg peso corporal).

Algunos trabajos han evidenciado cambios en la bioaccesibilidad de Hg cuando la digestión se produce en presencia de otros alimentos o componentes alimentarios (Shim et al., 2009; He y Wang, 2011; Ouédraogo y Amyot, 2011). Ouédraogo y Amyot (2011) muestran una reducción de la bioaccesibilidad que oscila entre 50-60% en presencia de café, té verde y té negro. Según estos autores, la reducción podría deberse a la presencia en estas bebidas de constituyentes como polifenoles y fibra dietaria, que podrían actuar como quelantes de metales. Los estudios anteriormente citados indican que algunos componentes de la dieta podrían reducir la entrada de Hg a la circulación sistémica creando complejos de solubilidad reducida con el metal durante el proceso digestivo, lo que supondría una disminución de su absorción. Teniendo en cuenta este hecho, en el presente estudio se han evaluado compuestos presentes en los alimentos que pudieran afectar a la bioaccesibilidad de Hg con el fin de poder aplicarlos como estrategias para la reducción de su absorción tras su ingesta. Dichos componentes se han seleccionado en base a su capacidad como quelantes de Hg o de otros cationes y siempre teniendo en cuenta que se tratase de compuestos de origen alimentario o cuya aplicación estuviese permitida. Asimismo, se han empleado concentraciones dentro de los rangos habituales en los alimentos.

Los resultados obtenidos indican que la mayoría de los compuestos ensayados pueden reducir la fracción soluble de  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  en disolución acuosa, además muchos de ellos reducen la fracción de Hg solubilizado tras la digestión de la matriz alimentaria en estudio. Por tanto, estos compuestos podrían catalogarse como buenos candidatos para el diseño de estrategias encaminadas a reducir la biodisponibilidad oral de Hg. Así mismo, en la mayoría de los casos no se pone de manifiesto una

reducción de la fracción bioaccesible de otros minerales y/o proteínas, lo que confirma su idoneidad.

Es destacable el efecto de algunos de estos compuestos que pueden llegar a reducir más de un 75% la cantidad de Hg disponible para la absorción. Este es el caso del ácido tánico, pectina, lignina y algún derivado de celulosa. Los compuestos eficaces son moléculas complejas que forman parte de la fibra dietaria, resistentes a la digestión en el intestino delgado, lo que facilitaría que tras la formación del complejo con el Hg esté no se degradara a su paso por el tracto intestinal. El ácido tánico se considera una fibra dietética que se encuentra junto con otros taninos en varias bebidas como es el vino tinto, cerveza, café, té negro, té verde y muchos vegetales (Gülçin et al., 2010). El ácido tánico está reconocido como un agente saborizante de alimentos, incluido en la lista de la Unión Europea de los aromas alimentarios (Reglamento UE 872/2012). Estudios previos han puesto de manifiesto que este compuesto puede unir cationes divalentes. Cruz et al. (2000) demostraron que el ácido tánico forma complejos con Zn y Pb. Winiarska-Mieczan et al. (2013) han demostrado que la co-administración de una disolución al 2% de ácido tánico con Pb o Cd es un método eficaz para reducir la acumulación de estos tóxicos en ratas. Por otro lado, hay que destacar la actividad antioxidante del ácido tánico, especialmente por su capacidad de secuestrar radicales libres (Andrade et al., 2005; Gülçin et al., 2010).

Al igual que el ácido tánico, la pectina presenta un número importante de grupos carboxílicos libres. Algunos estudios han evidenciado que estos grupos son capaces de unirse fuertemente a cationes metálicos polivalentes (Dronnet et al., 1996; Kartel et al., 1999). La pectina se ha demostrado eficaz en la reducción de la acumulación de Pb ingerido vía oral en animales de experimentación (Khotimchenko et al., 2006; Serguschenko et al., 2007). Las pectinas no amidadas y sus sales son componentes de nuestra dieta, ya que están presentes en numerosos frutos. Además, ambas formas de pectina están autorizadas en la industria alimentaria como agentes gelificantes, espesantes, estabilizantes y emulsionantes (Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo del 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios). Su seguridad se ha puesto de manifiesto en estudios de exposición crónica en roedores, donde tras una exposición de dos años a un 10% de pectina (amidadas y no amidadas) en la dieta, los animales no presentaron efectos adversos (JECFA, 1974). Incluso se ha reportado que este polisacárido puede tener efectos beneficiosos, disminuyendo los niveles de colesterol y glucosa en sangre (Brouns et al., 2012; Jones et al., 2015).

La lignina ha sido el componente que ha conllevado los mayores descensos en la bioaccesibilidad de Hg. Se trata de un polímero extremadamente complejo que aparece en determinados productos de origen vegetal como es el trigo, tubérculos (zanahoria, rábano) y frutas con semillas comestibles como las fresas (Gropper et al., 2009). Su afinidad por metales se ha descrito principalmente en cationes divalentes como el Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Ni(II) (García-Valls et al., 2003; Guo et al., 2008). De



hecho, la lignina se ha propuesto como un adsorbente de bajo coste para eliminar metales de suelos y aguas contaminadas (Zhuang et al., 2004). El hecho de ser una fibra dietaria hace que su consumo esté cuestionado por el posible efecto en la absorción de minerales. El consumo diario medio estimado de lignina es de 1-1,7g en países desarrollados donde el consumo de fibra oscila entre 16,3 y 43,4 g/día (Tungland y Meyer, 2002). En el presente estudio, se observan reducciones elevadas de la bioaccesibilidad de Hg en pescado empleando cantidades inferiores a las ingestas habituales, por tanto podemos decir que no se exceden valores que podrían comprometer la absorción de otros nutrientes. Este punto también viene en parte avalado por los resultados de bioaccesibilidad de Ca, Mg, P, K y proteínas obtenidos en el presente trabajo que muestran que la presencia de lignina no reduce la cantidad de estos nutrientes disponible para la absorción. Sin embargo, si se observa una reducción del Fe bioaccesible. Hay que indiciar que los productos pesqueros, aunque fuentes de este mineral, no se consideran sus principales contribuidores en la dieta. Sin embargo, si el empleo de lignina se considera finalmente una buena estrategia *in vivo*, habría que valorar si su incorporación a la dieta supone cambios en el estado nutricional de los animales de experimentación. De ser así, este compuesto no podría ser utilizado con este fin.

Finalmente hay que destacar la eficacia en la reducción del Hg bioaccesible de la mayoría de los derivados de celulosa empleados. Franco et al. (2007) pusieron de manifiesto la eficacia de la carboximetil celulosa (CMC) como adsorbente de cationes ( $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mo^{6+}$ ) que, según estos autores, se debía a los grupos hidroxílicos y carboxílicos. Los derivados de celulosa empleados en el presente estudio son de uso alimentario y se encuentran en unas cantidades que no superan los valores habituales en la dieta. Los estudios existentes también avalan su seguridad tras la ingesta. Se ha observado que CMC es tolerada en seres humanos tras administrarles una dosis de 6 g/día. Un estudio llevado a cabo en ratas expuestas durante 2 años a 0,1% y 5% de MC y HPMC en la dieta puso de manifiesto que no existían efectos en la mortalidad, peso corporal, ingesta de alimentos, hematología, niveles de componentes en suero o incidencia de tumores (McCollister et al., 1973). Además se ha comprobado que algunos de estos derivados reducen el colesterol en sangre (Maki et al., 1999).

## 5. CONCLUSIONES

Algunas de las muestras de atún presentes en el mercado superan el límite máximo permitido, en concreto, un 26% presentan contenidos superiores a 1 mg/kg. En determinados casos, el consumo de una ración habitual (150 g) por semana puede suponer una exposición oral a dicho contaminante superior a la Ingesta Semanal de  $CH_3Hg$  recomendada por la FAO/OMS (1,6  $\mu g/kg$  peso corporal). Por tanto, es necesaria la búsqueda de soluciones para reducir la exposición oral a Hg a través de los alimentos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la integración de derivados de celulosa, ácido tánico, lignina o pectina en la dieta, bien en forma de suplementos o bien adicionados a los alimentos, pueden ser soluciones para reducir la biodisponibilidad oral de Hg. Estos componentes no son perjudiciales para la salud, pues a las concentraciones empleadas en el presente estudio forman parte de una dieta habitual. Además, su empleo no reduce de forma relevante la biodisponibilidad de otros nutrientes existentes en el atún. Es necesario evaluar si este efecto observado *in vitro* se confirma *in vivo*, ya que la interacción observada durante la digestión podría verse afectada por otros componentes presentes en el lumen, especialmente por la acción de la microbiota intestinal. Además hay que confirmar, también *in vivo*, que la incorporación de estos compuestos a la dieta no afecta al estado nutricional, debido a la reducción en la absorción de otros minerales o macronutrientes.

## 6. REFERENCIAS

- Andrade, R. G.; Dalvi, L. T.; Silva, J. M. C.; Lopes, G. K. B.; Alonso, A.; Hermes-lima, M. 2005. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals, *Biochim. Biophys*, 437, 1-9.
- Brouns, F.; Theuwissen, E.; Adam, A.; Bell, M.; Berger, A.; Mensink, R. P. 2012. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *J. Clinic Nutr*, 66, 591-599.
- Cabañero, A. I.; Madrid, Y.; Cámara, C. 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal. Chim.*, 526, 51-61.
- Canuel, R.; de Grosbois, S. B.; Lucotte, M.; Atikessé, L.; Larose, C.; Rheault, I. 2006. New evidence on the effects of tea on mercury metabolism in humans. *Arch. Environ. Occup. Health*, 61, 232-238.
- Crist, D. R.; Crist, R. H.; Martin, J. R. 2003. A new process for toxic metal uptake by a kraft lignin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78, 199-202.
- Cruz, B. H., Díaz-Cruz, J. M., Ariño, C., Esteban, M. 2000. Heavy Metal Binding by Tannic Acid: A Voltammetric Study. *Electroanalysis*, 12, 1130-1137.
- Dronnet, V. M., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., Thibault, J. -F. 1996. Characterisation and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydr. Polymer.*, 30, 253-263.
- EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 2012, 10(12), 2985.
- Franco, A. P.; Lobo Recio, M. A.; Szpoganicz, B.; López Delgado, A.; Felcman, J.; Ramalho Mercê, A. L. 2007. Complexes of carboxymethylcellulose in water. Part 2.  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  remediation studies of wastewaters with  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$  and  $\text{Mo}^{6+}$ . *Hydrometallurgy*, 87, 178-189.
- FSA, Food Standards Agency. Mercury in imported fish and shellfish, UK farmed fish and their products (40/03). 2003, [en línea]. Dirección URL: <<http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis-2003/fsis402003>>. [Consulta: 20 Abr. 2015]

- Garcia-Valls, R.; Hatton, T. A. 2003. Metal ion complexation with lignin derivatives. *Chem. Engin. J.*, 94, 99-105.
- Gropper, S.S.; Smith J. L.; Groff, J. L. 2009. Fiber. En: Advanced nutrition and human metabolism, 5th Edition. Wadsworth, Cengage Learning, Belmont, CA, USA, 107-130.
- Gülçin, I; Huyut, Z.; Elmastas, M.; Aboul-Enein, H. Y. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab. J. Chem.*, 3, 43-53.
- Guo, X.; Zhang, S.; Shan, X.-Q. 2008. Adsorption of metal ions on lignin. *J. Hazard. Mater.*, 151, 134-142.
- Hajeb, P.; Jinap, S. 2009. Effects of washing pre-treatment on mercury concentration in fish tissue. *Food Addit. Contam.*, 26, 1354-1361.
- Hajeb, P.; Jinap, S. 2012. Reduction of mercury from mackerel fillet using combined solution of cysteine, EDTA, and sodium chloride. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 6069-6076.
- He, M.; Wang, W.-X. 2011. Factors affecting the bioaccessibility of methylmercury in several marine fish species. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 7155-7162.
- Health Canada. Mercury in Fish: Consumption Advice: Making Informed Decisions about fish. 2008, [en línea]. Dirección URL: <<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/environ/mercur/cons-adv-etud-eng.php>>. [Consulta: 20 Abr. 2015]
- Janle, E. M.; Freiser, H.; Manganais, C.; Chen, T.-Y.; Craig, B. A.; Santerre, C. R. 2015. Green tea increases the concentration of total mercury in the blood of rats following an oral fish tissue bolus. *BioMed Res. Int.*, ID 320936.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1974. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Seventeenth Report of JECFA, World Health Organization. Technical Report Serie No. 539.
- Jones, M.; Gu, X.; Stebbins, N.; Crandal, P.; Ricke, S.; Lee, S.-O. 2005. Effects of soybean pectin on blood glucose and insulin responses in healthy men. *FASEB J.*, 29, 596.16.
- Kalač, P.; Svoboda, L. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.*, 69, 273-281.
- Kartel, M. T.; Kupchik, L. A.; Veisov, B. K. 1999. Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions. *Chemosphere*, 38, 2591-2596.
- Khotimchenko, M.; Serguschenko, I.; Khotimchenko, Y. 2006. Lead absorption and excretion in rats given insoluble salts of pectin and alginate. *Int. J. Toxicol.*, 25, 195-203.
- Laparra, J. M.; Vélez, D.; Montoro, R.; Barbera, R.; Farre, R. 2003. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6080-6085.
- Maki, K. C.; Davidson, M. H.; Malik, K. C.; Albrecht, H. H.; O'Mullane, J.; Daggy, B. P. 1999. Cholesterol lowering with high-viscosity hydroxypropylmethylcellulose. *Am. J. Cardiol.*, 84, 1198-1203.
- McCollister S. B.; Kociba, R.J; McCollister D.D. 1973. Dietary feeding studies of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Food Cosm. Toxicol.*, 11, 943-953.
- NRC (United States National Research Council), Commission on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology. 2000. Toxicological effects of methylmercury. National Academy Press, 22, 568-577.
- NTP (National Toxicology Program), 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies) (as modified based on peer review), NTP TR 408, NIH publication no. 91-3139, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.

- Oliveira, R.C.; Dórea, J.G.; Bernardi, J.V.; Bastos, W.R.; Almeida, R.; Manzatto, A.G. 2010. Fish consumption by traditional subsistence villagers of the Rio Madeira (Amazon): impact on hair mercury. *Ann. Hum. Biol.*, 37, 629-642.
- Ouédraogo, O.; Amyot, M. 2011. Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish. *Environ. Res.*, 111, 1064-1069.
- Piotrowski, J.K.; Szymanska, J.A.; Skrzypinska-Gawrysiak, M.; Kotelo, J.; Sporny, S. 1992. Intestinal absorption of inorganic mercury in rat. *Pharmacol. Toxicol.*, 70, 53-55.
- Rahola, T.; Hattula, T.; Korolainen, A.; Miettinen, J.K. 1973. Elimination of free and protein-bound ionic mercury ( $20\text{Hg}^{2+}$ ) in man. *Ann. Clin. Res.*, 5, 214-219.
- Reglamento (UE) No 872/2012 de la Comisión, de 1 October 2012, por el que se adopta la lista de sustancias aromatizantes previstas en el Reglamento (CE) No 2232/96. Diario Oficial de la Unión Europea 2012, L267, 1-161.
- Reglamento CE No 1881/2006. Diario Oficial de la Unión Europea, [en línea]. Dirección URL: <<http://eur-lex.europa.eu/>>. [Consulta:27 Abr 2015].
- Reglamento CE No 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, enzimas y aromas alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, [en línea]. Dirección URL: <<http://eur-lex.europa.eu/>>. [Consulta:20 Marz 2015].
- Reglamento UE No 872/2012. Diario Oficial de la Unión Europea, [en línea]. Dirección URL: <<http://eur-lex.europa.eu/>>. [Consulta:3 Jun 2015].
- Rowland, I. R.; Robinson, R. D.; Doherty, R. A. 1984. Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. *Arch. Environ. Health.*, 39, 401-408.
- Rowland, I. R.; Mallett, A. K.; Flynn, J.; Hargreaves, R. J. 1986. The effect of various dietary fibres on tissue concentration of chemical form of mercury after methylmercury exposure in mice. *Arch. Toxicol.*, 59, 94-98.
- Sasser, L. B.; Jarboe, G. E.; Walter, B. K.; Kelman, B. J. 1978. Absorption of mercury from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 157, 57-60.
- Serguschenko, I.; Kolenchenko, E.; Khotimchenko, M. 2007. Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. *J. Nutr.*, 27, 633-639.
- Shim, S. M.; Ferruzzi, M. G.; Kim, Y. C.; Janle, E. M.; Santerre, C. R. 2009. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chem.*, 112, 46-50.
- Torres-Escribano, S.; Ruiz, A., Barrios, L.; Vélez, D.; Montoro, R. 2011. Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 981-986.
- Tungland, B.C.; Meyer, D. 2002. Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 3, 90-103.
- U.S. EPA, US Environmental Protection Agency. 2004. What you need to know about mercury in fish and shellfish. Washington, DC. US *Environmental Protection Agency*, [en línea] Dirección URL: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/admethylmercury3.html>>. [Consulta:20 Abr 2015].
- Winiarska-Mieczan, A.; Krusiński, R.; Kwiecień M. 2013. Tannic Acid influence on lead and cadmium accumulation in the hearts and lungs of rats. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 22, 615-620.
- Yannai, S.; Sachs, K. M. 1993. Absorption and accumulation of cadmium, lead and mercury from foods by rats. *Food Chem. Toxicol.*, 31, 351-355.
- Zhuang, J. M., Walsh, T., Lam, T. 2003. A new technology for the treatment of mercury contaminated water and soils, *Environ. Technol.*, 24, 897-902.