



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Estrategias dietéticas para disminuir la biodisponibilidad de mercurio desde alimentos

Tesis Doctoral

Carlos Alberto Jadán Piedra

Dirigida por:

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Valencia, julio 2017

Dinoraz Vélez Pacios y Vicenta Devesa i Pérez, ambas Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR QUE: El trabajo de investigación titulado “**Estrategias dietéticas para disminuir la biodisponibilidad de mercurio desde alimentos**” que presenta D. Carlos Alberto Jadán Piedra para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC) bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, 7 de julio de 2017



Dra. Dinoraz Vélez Pacios



Dra. Vicenta Devesa i Pérez

A mi familia

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Muchas gracias a mi familia. A mis padres Arturo y Nelly, mi hermano Felipe, mis hermanas Fabiola y Vanessa, mis cuñados Fernando y Pedro, mis sobrinos Isaac, Isabella y un nuevo sobrino que está en camino por brindarme siempre su apoyo y confianza, por ser una fuente de ánimo.

A mis directoras de tesis Vicenta Devesa i Pérez (Vicen) y Dinoraz Vélez Pacios (Deni) deseo expresar un sincero y profundo agradecimiento por los conocimientos impartidos, por la guía e instrucción junto con su paciencia e interés en mi proceso de aprendizaje, sin su ayuda este trabajo no podría haberse realizado.

A mis compañeras de laboratorio Gabi y Chusa por su compañerismo, amistad y colaboración. Siempre recordaré los buenos momentos, sus comentarios positivos, las charlas y todo el tiempo que pasamos juntos, el carisma y don de gente de Gabi, la empatía y constancia de Chusa, los consejos, prudencia y demás cualidades de ambas, por todo esto deseo expresar mi gratitud a las dos por haber hecho agradable mi estancia en el laboratorio 204. Espero verlas pronto y les deseo el mayor éxito posible en su vida personal y profesional.

A Vicente Monedero y Manuel Zúñiga del grupo de Bacterias lácticas y probióticos, a Sergi Puig del laboratorio de biología de sistemas en levaduras de interés biotecnológico, todos del IATA-CSIC donde realicé colaboraciones científicas, muchas gracias por su colaboración y ayuda.

A Marta Baquedano, Virginia Sánchez y Cristina Alcántara (Cris); muchas gracias por el apoyo diligente que dieron a este trabajo.

A mis compañeros que ya se graduaron Marta Vázquez y René Rocha por sus buenos deseos, gracias a ambos.

A los miembros de mi grupo de trabajo que me han ayudado durante mi tesis doctoral Maite de la Flor, Antonio Ruiz y Álvaro Crespo.

A las personas que realizaron prácticas en el laboratorio 204 y que han contribuido en esta tesis, gracias por su valiosa colaboración: Bea, Marta, Jonatán, Diana y José.

Al laboratorio de envases, a Ramón Catalá, Rafa Gavara, Pilar Hernández, Gracia López, Laura Higuera y Josep Pascual por su buena voluntad en el préstamo de equipos y material cuando lo necesitaba, por los buenos momentos. A Hortensia Silla que también ha compartido con todos nosotros cafés y tertulias.

A Pilar Bermejo, Raquel Domínguez y Antonio Moreda de USC, gracias por acogerme en su grupo e introducirme en el mundo del ICP-MS.

A los compañeros, colegas y amigos del IATA-CSIC y la UPV, les deseo mucho éxito en sus respectivos países; ha sido un gusto haberles conocido: Johanna, Alejandra, Arantxa, Mónica, María E, Soulef, Atafe, Linda, Ali M, Ali S, Mahboobeh, Flor, Adriane, Ramón, Erik, Marta G, Estéfani, Xavi, Yaiza, Temo, Jaime L, Óscar, Ana P, Nubia, Mary, Lola, Cristina, Ayoub, Susana y Kevin.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), del Gobierno de Ecuador que al otorgarme la beca me ha permitido la realización de estos estudios.

Por último, un agradecimiento al IATA-CSIC que me ha acogido durante estos años y donde algún día espero regresar.

Con todos he compartido algún momento durante mi estancia en España, espero haber dejado un buen recuerdo.

Moltes gràcies a tots perquè al llarg d'aquest camí he pogut créixer personal i acadèmicament.

RESUMEN

El mercurio (Hg) es un metal tóxico ampliamente distribuido en el medio ambiente. La principal vía de exposición para el ser humano la constituye la dieta, donde se presenta en forma inorgánica [Hg(II)] o como metilmercurio (CH₃Hg). Dentro de los alimentos que presentan elevados contenidos de este metal destacan los productos pesqueros, especialmente los grandes depredadores marinos, y las setas. La necesidad de reducir la exposición a Hg de la población, especialmente de aquellos grupos que viven en zonas contaminadas o aquellas poblaciones en las que los productos pesqueros son una base importante de sus dietas, es una prioridad. Sin embargo, no es una tarea fácil evitar la contaminación del alimento o eliminar el contaminante previo a su consumo. Es por tanto necesario buscar vías alternativas para disminuir la exposición a Hg sin eliminar de la dieta alimentos con un alto valor nutritivo. Entre estas posibles vías de actuación está la de reducir selectivamente la llegada del tóxico a la circulación sanguínea tras su ingesta oral, sin comprometer la llegada de otros elementos esenciales y empleando para tal fin, compuestos cuya seguridad alimentaria esté probada. Este ha sido el objetivo principal de la presente tesis doctoral.

Se ha llevado a cabo una caracterización inicial de la fracción bioaccesible de los alimentos con mayores contenidos de Hg para determinar el riesgo asociado a su ingesta. Los datos han mostrado que la cantidad de Hg que se libera durante la digestión del alimento es inferior al contenido inicial de la muestra y que ésta se ve especialmente afectada por el pH de la digestión gástrica y, en el caso de productos pesqueros, por la concentración de pepsina y lipasa pancreática. La evaluación del ratio molar selenio (Se)/Hg muestra que en las fracciones bioaccesibles hay por lo general, un exceso molar de Se, lo que según algunos estudios indica un menor riesgo asociado. Así, aunque una parte importante de estas matrices superan el límite legislado para Hg y su ingesta superaría la ingesta semanal recomendada, puede que el riesgo asociado no sea tan elevado si tal y como se observa *in vitro* la

llegada de Hg a la circulación sistémica es menor de la esperada y el aporte de Se y su absorción son elevados.

El intento de disminuir la biodisponibilidad de Hg se ha abordado mediante la búsqueda de componentes alimentarios o microorganismos de grado alimentario capaces de disminuir la bioaccesibilidad del Hg tras la digestión o de disminuir su transporte a través de la pared intestinal. Las aproximaciones iniciales se han llevado a cabo *in vitro* empleando una digestión gastrointestinal simulada y modelos celulares de epitelio intestinal.

Se ha evidenciado que determinados tipos de celulosa, el ácido tánico, la pectina y la lignina son compuestos alimentarios con una elevada capacidad de unión a ambas formas mercuriales, la cual se mantiene durante la digestión gastrointestinal, incluso se muestran eficaces reduciendo la bioaccesibilidad de Hg desde productos pesqueros y setas. Estos tratamientos no modifican la forma química inicial del Hg, sin embargo, presentan el inconveniente de que en algunos casos reducen la bioaccesibilidad de elementos esenciales. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la digestión en presencia de bacterias lácticas del género *Lactobacillus* y de *Saccharomyces cerevisiae* también produce una elevada reducción de la bioaccesibilidad del Hg en disolución acuosa y del Hg presente en setas; sin embargo, estas estrategias no son efectivas reduciendo la bioaccesibilidad del Hg presente en productos pesqueros. El análisis de los posibles factores que influyen en la ineficacia de estos microorganismos en productos pesqueros indica que posiblemente la forma en que se libera el Hg de la matriz alimentaria impide que este metal pueda ser captado por bacterias y levaduras.

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que existen componentes de la dieta, principalmente los que presentan grupos tiol (cisteína, GSH y homocisteína) y suplementos ricos en estos componentes, así como cepas de *Lactobacillus* y *S. cerevisiae* que pueden reducir el transporte de Hg(II) y CH₃Hg a través de la

monocapa de células intestinales, afectando de esta forma directamente la absorción de Hg. Este efecto también se observa cuando se evalúa el transporte del Hg presente en la fracción bioaccesible de productos pesqueros.

La eficacia de algunos de estos compuestos y microorganismos en la reducción de la biodisponibilidad de Hg se ha evaluado en animales de laboratorio, comprobándose que la cisteína, el ácido tánico y algunas cepas bacterianas podrían ser estrategias eficaces para reducir la exposición oral a Hg. Estos datos preliminares *in vivo* deben ser confirmados con un mayor número de ensayos, pero en principio todo apunta a que componentes de la dieta o probióticos podrían reducir la biodisponibilidad de Hg, sin que su aplicación suponga un riesgo para el consumidor y con el valor añadido de tratarse de compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria, que a su vez podrían contrarrestar los posibles efectos tóxicos derivados de la ingesta de este metal.

RESUM

El mercuri (Hg) és un metall tòxic àmpliament distribuït en el medi ambient. La principal via d'exposició per a l'ésser humà la constitueix la dieta, on es presenta en forma inorgànica [Hg(II)] o com a metilmercuri (CH₃Hg). Dins dels aliments que presenten elevats continguts d'aquest metall destaquen els productes pesquers, especialment els grans depredadors marins, i els bolets. La necessitat de reduir l'exposició a Hg de la població, especialment d'aquells grups que viuen en zones contaminades o aquelles poblacions en les quals els productes pesquers són una base important de les seves dietes és una prioritat. No obstant això, no és una tasca fàcil evitar la contaminació de l'aliment o eliminar el contaminant previ al seu consum. És per tant necessari buscar vies alternatives per disminuir l'exposició a Hg sense eliminar de la dieta aliments amb un alt valor nutritiu. Entre les possibles vies d'actuació està la de reduir selectivament l'arribada del tòxic a la circulació sanguínia després de la seua ingesta oral, sense comprometre l'arribada d'altres elements essencials i emprant per a tal fi, composts amb seguretat alimentària provada. Est ha estat l'objectiu principal de la present tesi doctoral.

S'ha dut a terme una caracterització inicial de la fracció bioaccessible dels aliments amb majors continguts de Hg per determinar el risc associat a la seua ingesta. Les dades han mostrat que la quantitat de Hg que s'allibera durant la digestió de l'aliment és inferior al contingut inicial de la mostra i que aquesta es veu especialment afectada pel pH de la digestió gàstrica i, en el cas de productes pesquers, per la concentració de pepsina i lipasa pancreàtica. L'avaluació del ràtio molar seleni (Se)/Hg mostra que en les fraccions bioaccessibles hi ha en general, un excés molar de Se, la qual cosa segons alguns estudis indica un menor risc associat. Així, encara que una part important d'aquestes matrius alimentaries superen el límit legislat per Hg i la seua ingesta superaria la ingesta setmanal recomanada, pot ser que el risc associat no sigui tan elevat si tal com s'observa *in vitro* l'arribada de Hg

a la circulació sistèmica és menor de l'esperada i l'aportació de Se i la seua absorció són elevades.

S'ha evidenciat que determinats tipus de cel·lulosa, l'àcid tànic, la pectina i la lignina són compostos alimentaris amb una elevada capacitat d'unió a les formes mercurials, la qual es manté durant la digestió gastrointestinal, fins i tot es mostren eficaces reduint la bioaccessibilitat de Hg des de productes pesquers i bolets. Aquests tractaments no modifiquen la forma química inicial del Hg, però presenten l'inconvenient que en alguns casos redueixen la bioaccessibilitat d'elements essencials. Així mateix s'ha posat de manifest que la digestió en presència de bacteris làctics del gènere *Lactobacillus* i *Saccharomyces cerevisiae* també produeix una elevada reducció de la bioaccessibilitat del Hg en dissolució aquosa i del Hg present en bolets; no obstant això aquestes estratègies no són efectives reduint la bioaccessibilitat del Hg present en productes pesquers. L'anàlisi dels possibles factors que influeixen en la ineficàcia d'aquests microorganismos en productes pesquers indica que possiblement la forma en que s'allibera el Hg de la matriu alimentaria impedeix que aquest metall pugui ser captat per bacteris i llevats.

D'altra banda, s'ha posat de manifest que existeixen components de la dieta, principalment els que presenten grups tiol (cisteïna, GSH i homocisteïna) i suplementes rics en aquests components, així com soques de *Lactobacillus* i *S. cerevisiae* que poden reduir el transport de Hg(II) i CH₃Hg a través de la monocapa de cèl·lules intestinals, afectant d'aquesta forma directament l'absorció de Hg. Aquest efecte també s'observa quan s'avalua el transport del Hg present en la fracció bioaccessible de productes pesquers.

L'eficàcia d'alguns d'aquests compostos i microorganismes en la reducció de la biodisponibilitat de Hg s'ha avaluat en animals de laboratori, comprovant-se que la cisteïna, l'àcid tànic i algunes soques bacterianes podrien ser estratègies eficaces per reduir l'exposició oral a Hg. Aquestes dades preliminars *in vivo* han de ser

confirmades amb un major nombre d'assajos, però en principi tot apunta al fet que components de la dieta o probiotics podrien reduir la biodisponibilitat de Hg, sense que la seua aplicació suposi un risc per al consumidor i amb el valor afegit de tractar-se de compostos amb activitat antioxidant i antiinflamatoria, i per tant també podrien contrarestar els possibles efectes tòxics derivats de la ingesta d'aquest metall.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a toxic metal widely distributed in the environment. The main route of exposure for humans is the diet, where it is presented in inorganic form [Hg(II)] or as methylmercury (CH₃Hg). Seafood products, especially large marine predators, and mushrooms are the foods with the highest concentrations of this metal. The need to reduce Hg exposure of the population, especially those living in contaminated areas or those in which seafood products are an important basis of their diets, is a priority. However, it is not an easy task to avoid food contamination or to eliminate the contaminant prior to its consumption. It is therefore necessary to search for alternative ways to reduce exposure to Hg without eliminating from the diet these food products with a high nutritional value. One of these possible ways of action is to reduce selectively the arrival of Hg into the bloodstream after oral intake, without compromising the arrival of other essential elements and using for that purpose compounds whose food safety have been proven. This has been the main objective of this PhD thesis.

An initial characterization of the bioaccessible fraction of foods with high Hg contents was carried out to determine the risk associated with their intake. The data show that the amount of Hg that is released during the digestion of the food is lower than the initial content of Hg in the sample and that it is especially affected by the gastric pH and, in the case of seafood products, also by the pepsin and pancreatic lipase concentrations. The evaluation of the molar ratio selenium (Se)/Hg shows that in the bioaccessible fractions, there is usually a molar excess of Se, which according to some studies indicates a lower risk associated to the exposure. Thus, although a significant proportion of these matrices exceed the maximum level for Hg and their intake would exceed the recommended weekly intake, the associated risk may not be so high if, as it has observed *in vitro*, the arrival of Hg in the

systemic circulation is lower than expected and the contribution of Se and its absorption are high.

The attempt to decrease the bioavailability of Hg has been addressed by the search for food components or food-grade microorganisms capable of decreasing the bioaccessibility of Hg after digestion or of diminishing its transport through the intestinal wall. Initial approaches have been carried out *in vitro* using simulated gastrointestinal digestion and cellular models of intestinal epithelium.

It has been evidenced that certain types of cellulose, tannic acid, pectin and lignin are food compounds with a high binding capacity to both mercurial forms, which is maintained during gastrointestinal digestion and they are even effective in reducing the bioaccessibility of Hg from seafood products and mushrooms. These treatments do not modify the initial chemical form of Hg; however, they have the disadvantage that in some cases they reduce the bioaccessibility of essential elements. It has also been shown that digestion in the presence of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* also results in a high reduction of the bioaccessibility of Hg in aqueous solution and of Hg present in mushrooms; however, these strategies are not effective reducing the bioaccessibility of Hg present in seafood products. The analysis of the factors that could influence the inefficiency of these microorganisms in seafood products indicates that possibly the form in which Hg is released from the food matrix prevents this metal from being uptaken by bacteria and yeasts.

On the other hand, it has been shown that there are dietary components, especially those with thiol groups (cysteine, GSH and homocysteine) and supplements rich in these components, as well as strains of *Lactobacillus* and *S. cerevisiae* that can reduce the transport of Hg(II) and CH₃Hg through the monolayer of intestinal cells, thus affecting directly the absorption of Hg. This

effect is also observed when the transport of Hg present in the bioaccessible fraction of seafood products is evaluated.

The efficacy of some of these compounds and microorganisms in reducing the bioavailability of Hg has been evaluated in experimental animals, proving that cysteine, tannic acid and some bacterial strains could be effective strategies to reduce oral exposure to Hg. These preliminary data *in vivo* should be confirmed with a larger number of trials, but in principle everything indicates that the introduction of dietary components or probiotics in the diet could reduce the bioavailability of Hg without entailing a risk for the consumer. Additionally, these compounds or probiotics have antioxidant and antiinflammatory properties, which in turn could counteract the toxic effects derived from the ingestion of this metal.

Índice general

Índice general	i
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	xi
Abreviaturas	xiii
Introducción	1
1. Formas químicas de mercurio	3
2. Usos del mercurio	5
3. Fuentes de emisión de mercurio	6
4. Ciclo del mercurio	8
5. Fuentes dietarias de mercurio	10
6. Exposición dietaria a mercurio	12
7. Efectos de la exposición a mercurio	15
7.1. Efectos carcinogénicos	15
7.2. Efectos sobre el sistema nervioso y el desarrollo	16
7.3. Efectos sobre el sistema renal	18
7.4. Mecanismos de acción	19
7.5. Modulación del efecto tóxico del mercurio mediante la dieta	19
8. Toxicocinética	21
8.1. Absorción	21
8.2. Distribución	24
8.3. Metabolismo	25
8.4. Excreción	26
9. Estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad	27
9.1. Definición de bioaccesibilidad y biodisponibilidad	27
9.2. Modelos para la evaluación de la bioaccesibilidad. Aplicación a alimentos con especies mercuriales	30

9.3. Modelos <i>in vitro</i> para estudios de la absorción intestinal. Aplicación a la evaluación de alimentos con especies mercuriales	33
9.4. Modelos <i>in vivo</i> para estudios de la biodisponibilidad. Aplicación a la evaluación de especies mercuriales	37
9.5. Factores dietarios que afectan la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del mercurio	40
Objetivos	45
Metodología	49
1. Especies mercuriales	51
2. Muestras de alimentos	51
3. Digestión gastrointestinal simulada	51
4. Determinación de mercurio	54
5. Determinación de selenio	55
6. Determinación de elementos mayoritarios	58
7. Estimación del riesgo asociado a la ingesta de alimentos con mercurio	58
7.1. Forma química del mercurio en muestras de alimentos y sus fracciones bioaccesibles	58
7.2. Factores del proceso digestivo que afectan la bioaccesibilidad de mercurio desde alimentos. Evaluación del ratio molar Se/Hg	60
7.2.1. Influencia de la etapa de digestión en la solubilización de Hg y Se	61
7.2.2. Influencia de parámetros de la etapa gástrica en la solubilización de Hg y Se	61
7.2.3. Influencia de parámetros de la etapa intestinal en la solubilización de Hg y Se	62
8. Componentes de la dieta que afectan la bioaccesibilidad de mercurio	63
8.1. Influencia de los compuestos de origen alimentario en la bioaccesibilidad de mercurio	64
8.2. Influencia de las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la bioaccesibilidad de mercurio	67
9. Estudios <i>in vitro</i> sobre los componentes de la dieta que afectan la permeabilidad y acumulación intestinal de mercurio	71
9.1. Mantenimiento de los cultivos celulares	71

9.2. Ensayos de viabilidad celular en células intestinales	73
9.3. Evaluación de la permeabilidad aparente del mercurio	74
9.3.1. Cultivo de las células en sistemas bicamerales	74
9.3.2. Tratamiento de las fracciones bioaccesibles para los ensayos de permeabilidad	76
9.3.3. Ensayos de permeabilidad celular.....	77
9.3.4. Control de la integridad de la monocapa durante los ensayos de permeabilidad	79
10. Estudios <i>in vivo</i> de la biodisponibilidad de mercurio y el efecto de las estrategias dietarias	80
10.1. Evaluación de la concentración plasmática de Hg en función de la dosis empleada	81
10.2. Tratamiento con los componentes alimentarios.....	81
10.3. Tratamiento con las bacterias lácticas.....	82
10.4. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos.....	83
10.5. Sacrificio y extracción de órganos.....	84
11. Análisis estadístico.....	85
Capítulo 1	87
Resultados	90
1. Contenidos de mercurio y selenio en muestras de alimentos	90
2. Bioaccesibilidad de mercurio y selenio en alimentos	93
3. Influencia de la etapa digestiva sobre la bioaccesibilidad de mercurio y selenio	96
4. Influencia de parámetros de la etapa gástrica en la bioaccesibilidad de mercurio y en el ratio molar selenio/mercurio	98
4.1. pH gástrico	98
4.2. Concentración de pepsina	101
4.3. Tiempo de duración de la etapa gástrica	104
5. Influencia de parámetros de la etapa intestinal en la bioaccesibilidad de mercurio y en el ratio selenio/mercurio	105
5.1. Concentración de sales biliares	105

5.2. Concentración de lipasa pancreática	107
5.3. Tiempo de duración de la etapa intestinal	109
Discusión	112
Conclusiones	119
Capítulo 2	121
Resultados	125
1. Efecto de los componentes alimentarios sobre la solubilidad de mercurio en disoluciones patrón	125
2. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de mercurio desde disoluciones acuosas	127
3. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de mercurio desde alimentos	130
4. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de elementos esenciales y las formas químicas de mercurio	133
Discusión	137
Conclusiones	141
Capítulo 3	143
Resultados	147
1. Estudios sobre la capacidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de unir especies mercuriales	147
2. Efecto de las bacterias lácticas y <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de mercurio en disoluciones patrones	150
3. Efecto de las bacterias lácticas y <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de mercurio en alimentos	155
4. Factores que influyen en el efecto de bacterias lácticas y levaduras sobre la bioaccesibilidad de mercurio desde alimentos	156
4.1. Etapa digestiva	157
4.2. Concentración de bacterias y levaduras	159
4.3. Presencia de cisteína y albúmina	160
4.4. Presencia de cationes divalentes	165
4.5. Cepa de bacterias lácticas y <i>S. cerevisiae</i> empleada	167

5. Efecto de las bacterias lácticas y levaduras sobre la bioaccesibilidad de cationes esenciales y las formas químicas de mercurio.....	168
Discusión	170
Conclusiones	175
Capítulo 4	177
Resultados	181
1. Evaluación previa de la viabilidad celular	181
2. Evaluación de la integridad de la monocapa celular en los ensayos de transporte ...	181
3. Coeficientes de permeabilidad aparente en los distintos modelos celulares evaluados.....	182
4. Efecto de los componentes alimentarios sobre la permeabilidad de mercurio	183
4.1. Efecto sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de Hg(II)	183
4.2. Efecto sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de CH ₃ Hg	187
4.3. Influencia de suplementos dietéticos y extractos vegetales en la permeabilidad de Hg	190
4.4. Influencia de los componentes alimentarios y suplementos sobre la permeabilidad del mercurio presente en alimentos	191
5. Influencia de las bacterias lácticas y Saccharomyces sobre la permeabilidad de mercurio	193
5.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de Hg(II) y CH ₃ Hg	194
5.2. Efecto de las levaduras sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de Hg(II) y CH ₃ Hg	195
5.3. Efecto de las bacterias lácticas y Saccharomyces sobre la permeabilidad del Hg presente en alimentos	196
Discusión	198
Conclusiones	203
Capítulo 5	205
Resultados	208
1. Evaluación de la biodisponibilidad de disoluciones patrón de mercurio	208
2. Efecto de los componentes alimentarios sobre la toxicocinética de las disoluciones patrón de mercurio	212

2.1. Efecto de los componentes alimentarios sobre la biodisponibilidad	212
2.2. Efecto de los componentes alimentarios sobre la excreción fecal	215
2.3. Efecto de los componentes alimentarios sobre la acumulación tisular	217
3. Efecto de las bacterias lácticas sobre la toxicocinética de disoluciones patrón de mercurio	220
3.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la biodisponibilidad	220
3.2. Efecto de las bacterias lácticas sobre la excreción fecal	223
3.3. Efecto de las bacterias lácticas sobre la acumulación tisular	225
Discusión	229
Conclusiones	233
Conclusiones generales	235
Bibliografía	241
Anexo 1	275

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio	9
Figura 2. Mecanismos de transporte de las formas mercuriales en enterocitos	24
Figura 3. Conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad	30
Figura 4. Sistemas dinámicos de digestión <i>in vitro</i>	31
Figure 5. Técnicas <i>in vitro</i> para evaluar el transporte de un determinado compuesto .	33
Figure 6. Sistema bicameral para estudios de absorción intestinal empleando células Caco-2	34
Figura 7. Representación del área debajo la curva y diferentes parámetros farmacocinéticos	39
Figura 8. Esquema del proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	53
Figura 9. Cromatograma de una disolución patrón de CH ₃ Hg y Hg(II)	59
Figura 10. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad con células epiteliales del intestino	75
Figura 11. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial	76
Figura 12. Esquema de dosificación y toma de muestras en el estudio del efecto de los componentes alimentarios sobre la biodisponibilidad <i>in vivo</i>	82
Figura 13. Esquema de dosificación y toma de muestras en el estudio del efecto de bacterias lácticas sobre la biodisponibilidad <i>in vivo</i>	83
Figura 14. Influencia de la etapa de digestión en la bioaccesibilidad de Hg en pez espada	97
Figura 15. Influencia del pH gástrico en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada	99
Figura 16. Influencia del pH gástrico en la bioaccesibilidad de Hg en setas	101
Figura 17. Influencia de la concentración de pepsina en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada	102
Figura 18. Influencia del tiempo de duración de la etapa gástrica en la bioaccesibilidad de Hg en pez espada	104

Figura 19. Influencia de la concentración de sales biliares en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada	106
Figura 20. Influencia de la concentración de lipasa en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada	108
Figura 21. Influencia del tiempo de duración de la etapa intestinal en la bioaccesibilidad de Hg en pez espada	110
Figura 22. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de Hg(II)	128
Figura 23. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de CH ₃ Hg	129
Figura 24. Efecto de los componentes dietarios en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de pez espada	131
Figura 25. Efecto de los componentes dietarios en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de atún	132
Figura 26. Efecto de los componentes dietarios en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de setas	133
Figura 27. Efecto de la temperatura de incubación sobre la retención de Hg(II) y CH ₃ Hg por <i>S. cerevisiae</i> BY4741	148
Figura 28. Efecto del pH sobre la retención de Hg(II) y CH ₃ Hg por <i>S. cerevisiae</i> BY4741	149
Figura 29. Efecto del tiempo de incubación sobre la retención de Hg(II) y CH ₃ Hg por parte de <i>S. cerevisiae</i> BY4741	150
Figura 30. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de Hg(II)	151
Figura 31. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de CH ₃ Hg.....	152
Figura 32. Efecto de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de Hg(II)	153
Figura 33. Efecto de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de CH ₃ Hg	154

Figura 34. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos	155
Figura 35. Efecto de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos	156
Figura 36. Efecto de las levaduras sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas en las distintas etapas de digestión	158
Figura 37. Efecto de la concentración de bacterias sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas	159
Figura 38. Efecto de la concentración de levaduras sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas	160
Figura 39. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las bacterias lácticas	161
Figura 40. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las levaduras	162
Figura 41. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las bacterias lácticas durante la digestión	163
Figura 42. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las levaduras durante la digestión	164
Figura 43. Efecto de determinados cationes divalentes en la retención de Hg por bacterias	165
Figura 44. Efecto de determinados cationes divalentes en la retención de Hg por levaduras	166
Figura 45. Efecto de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas	167
Figura 46. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de Hg(II)	185
Figura 47. Efecto de los componentes alimentarios sobre la retención celular de Hg(II)	186
Figura 48. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de CH ₃ Hg	188

Figura 49. Efecto de los componentes alimentarios sobre la retención celular de CH ₃ Hg	189
Figura 50. Efecto de los suplementos dietéticos o extractos vegetales sobre el transporte de Hg(II) y CH ₃ Hg	191
Figura 51. Concentración de Hg en plasma en función del tiempo en ratones expuestos a Hg(II)	209
Figura 52. Concentración de Hg en plasma en función del tiempo en ratones expuestos a CH ₃ Hg	210
Figura 53. Valores del área debajo de la curva (AUC) en función de la concentración de Hg(II)	211
Figura 54. Valores del área debajo de la curva (AUC) en función de la concentración de CH ₃ Hg	212
Figura 55. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con Hg(II) y componentes alimentarios.....	213
Figura 56. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con CH ₃ Hg y componentes alimentarios	214
Figura 57. Acumulación tisular en ratones expuestos a Hg(II) o CH ₃ Hg y componentes alimentarios	218
Figura 58. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con Hg(II) y bacterias lácticas	221
Figura 59. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con CH ₃ Hg y bacterias lácticas	222
Figura 60. Excreción fecal en ratones expuestos a Hg y bacterias lácticas	224
Figura 61. Acumulación tisular en ratones expuestos a Hg(II) o CH ₃ Hg y bacterias lácticas	226

Índice de tablas

Tabla 1. Especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales	4
Tabla 2. Emisiones antropogénicas mundiales de mercurio a la atmósfera procedentes de diversos sectores	7
Tabla 3. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Hg mediante CV-AFS	55
Tabla 4. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Se mediante HG-AFS	56
Tabla 5. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Se mediante ICP-MS	57
Tabla 6. Parámetros instrumentales del ICP-MS para la especiación de Hg	60
Tabla 7. Compuestos alimentarios empleados en los ensayos de bioaccesibilidad	66
Tabla 8. Cepas de bacterias lácticas ensayadas	68
Tabla 9. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ensayadas	68
Tabla 10. Componentes alimentarios, suplementos dietéticos o extractos vegetales empleados en los estudios de permeabilidad celular	78
Tabla 11. Contenidos de Hg y Se y ratio molar Se/Hg en muestras de pez espada	92
Tabla 12. Contenidos de Hg y Se y ratio molar Se/Hg en muestras de setas deshidratadas	93
Tabla 13. Bioaccesibilidad de Hg y Se en muestras de pez espada	95
Tabla 14. Bioaccesibilidad de Hg y Se en muestras de setas deshidratadas	96
Tabla 15. Efecto de los componentes alimentarios sobre la solubilidad del Hg	126
Tabla 16. Modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de alimentos tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios	135
Tabla 17. Modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de setas tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de bacterias lácticas o <i>S. cerevisiae</i>	169

Tabla 18. Coeficientes de permeabilidad aparente en los modelos celulares ensayados	183
Tabla 19. Efecto de los compuestos alimentarios y los suplementos dietéticos o extractos vegetales sobre el transporte de Hg desde pez espada	192
Tabla 20. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de Hg y CH ₃ Hg	195
Tabla 21. Efecto de <i>S. cerevisiae</i> sobre el transporte de Hg(II) y CH ₃ Hg	196
Tabla 22. Efecto de las cepas de bacterias lácticas y levaduras sobre el transporte de Hg desde pez espada	197
Tabla 23. Biodisponibilidad relativa (F) del Hg(II) y CH ₃ Hg en animales co-expuestos a las formas mercuriales y componentes alimentarios	215
Tabla 24. Excreción fecal en ratones expuestos a Hg y componentes alimentarios	216
Tabla 25. Biodisponibilidad relativa (F) del Hg(II) y CH ₃ Hg en animales co-expuestos a las formas mercuriales y bacterias lácticas	223

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
Arg	Arginina
AUC	Área debajo de la curva
BL	Bacteria láctica
BSA	Albúmina de suero bovino
CDR	Cantidad diaria recomendada
CH ₃ Hg	Metilmercurio
CMC	Carboximetilcelulosa
CV-AFS	Generación de vapor frío acoplado a espectroscopía de fluorescencia atómica
Cys	Cisteína
DHLA	Ácido lipoico reducido
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEMc	Medio DMEM suplementado para células Caco-2
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
F	Biodisponibilidad relativa
FSA	Food Safety Agency (UK)
GRAS	Generally recognized as safe
GSH	Glutación

Abreviatura	Nombre
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
Hcys	Homocisteína
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
Hg(II)	Mercurio inorgánico divalente (mercurio mercúrico)
HG-AFS	Generación de hidruros acoplado a espectroscopía de fluorescencia atómica
HPC	Hidroxipropilcelulosa
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HT-DMEM	Medio DMEM suplementado para células HT29-MTX
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ICP-MS	Espectrometría de masa acoplada a plasma inductivo
ICP-OES	Espectrofotometría de emisión acoplada a plasma inductivo
IST	Ingesta semanal tolerable
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA)
LOAEL	Dosis con efectos adversos mínimos
LY	Lucifer yellow
Lys	Lisina
MC	Metilcelulosa
MEM	Medio esencia mínimo con sales de Earle
Met	Metionina
MRS	Medio Man, Rogosa y Sharpe

Abreviatura	Nombre
NCM-DMEM	Medio DMEM suplementado para células NCM460
NOAEL	Dosis sin efectos adversos observables
NRC	National Research Council (EEUU)
OMS	Organización Mundial de la Salud
P_{app}	Coefficiente de permeabilidad aparente
PBS	Tampón fosfato salino
pc	Peso corporal
pf	Peso fresco
Phe	Fenilalanina
ps	Peso seco
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
SeMet	Seleniometionina
SFB	Suero fetal bovino
SHIME	Simulator of human intestinal microbial ecosystem
TIM	TNO intestinal model [®]
UFC	Unidades formadoras de colonia
UNEP	United Nations Environment Programme
U.S. EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Introducción

1. FORMAS QUÍMICAS DEL MERCURIO

El mercurio fue identificado por primera vez como elemento por el químico francés Antoine Laurent de Lavoisier durante sus investigaciones sobre la composición del aire. El símbolo del mercurio (Hg) deriva de la palabra griega hydrargyros, "agua plateada", llamado así debido a su apariencia a temperatura ambiente. Este elemento, que pertenece a los metales de transición, tiene siete isótopos estables, siendo el ^{202}Hg el más abundante (29,86%). Es uno de los elementos estables más pesados presentes en la naturaleza, con una densidad de 13,53 g/cm³.

El mercurio es un elemento poco abundante en la corteza terrestre donde ocupa el lugar 67 en orden de abundancia. Llega al medioambiente por causas naturales (erupciones volcánicas, emisiones desde océanos, erosiones de rocas) o antropogénicas debido a actividades mineras e industriales. Experimenta complejas transformaciones en la atmósfera, el medio terrestre y acuático, donde puede encontrarse en tres formas químicas: mercurio elemental, mercurio inorgánico y mercurio orgánico. La tabla 1 muestra las especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales.

El mercurio elemental o mercurio metálico [Hg(0)] es la única especie metálica líquida a temperatura y presión ambiental. Debido a su alta presión de vapor (163×10^{-3} Pa), evapora fácilmente a temperatura ambiente, siendo la especie de mercurio mayoritaria en la atmósfera. Los yacimientos de cinabrio (sulfuro de mercurio) son la principal fuente mineral para la extracción comercial de mercurio metálico. La forma metálica se refina por calentamiento del cinabrio a temperaturas superiores a los 540 °C. Este proceso evapora el mercurio contenido en el mineral, que posteriormente es condensado para formar el mercurio metálico líquido.

Los compuestos inorgánicos de mercurio presentan dos estados de oxidación, mercurio mercurioso [Hg(I)] y mercurio mercúrico [Hg(II)]. El Hg(II) es el más abundante en la naturaleza y tiene una elevada reactividad. Presenta una alta

afinidad por ligandos dadores de nitrógeno, fósforo y azufre; también genera complejos muy estables con bromo, yodo y cloro. Las sales de mercurio inorgánico más habituales son HgS, HgO y HgCl₂ (JECFA, 2011; EFSA, 2012). Algunas sales de mercurio (como el HgCl₂) son bastante volátiles y pueden encontrarse en la atmósfera; sin embargo, su elevada solubilidad en agua y reactividad química hacen que su deposición desde la atmósfera sea mucho más rápida que la del mercurio elemental.

En los compuestos orgánicos el átomo de mercurio está unido a uno o dos grupos alquil o aril, generando especies del tipo RHgX o RHgR' donde R y R' representan los grupos alquil o aril (CH₃-, C₂H₅-, C₆H₅-) y X es un anión (haluro, nitrato, sulfato). Las principales especies orgánicas son el metilmercurio, dimetilmercurio, etilmercurio y fenilmercurio, siendo el metilmercurio la especie más abundante en el medioambiente (EFSA, 2012).

	Especie	Fórmula
Mercurio elemental	Hg(0)	Hg ⁰
Iones inorgánicos de mercurio	Ión mercurioso	Hg ₂ ⁺²
	Ión mercúrico	Hg ⁺²
Especies orgánicas de mercurio	Metilmercurio	CH ₃ Hg ⁺
	Dimetilmercurio	(CH ₃) ₂ Hg
	Etilmercurio	CH ₃ CH ₂ Hg ⁺
	Fenilmercurio	C ₆ H ₅ Hg ⁺

Tabla 1. Especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales (EFSA, 2012).

2. USOS DEL MERCURIO

El extenso empleo del mercurio se debe a sus características especiales: líquido a temperatura ambiente, buen conductor eléctrico, densidad y tensión superficial elevadas, capacidad para expandirse o contraerse en respuesta a cambios de presión y temperatura (Del Cerro-Martín, 2012).

Entre los procesos industriales que utilizan mercurio destaca la producción de cloro y de sosa cáustica, la producción de cloruro de vinilo monómero y la extracción de oro y plata de minerales. El mercurio es utilizado en la fabricación de espejos, termómetros, barómetros, baterías, lámparas, aparatos eléctricos y explosivos (EFSA, 2012). También ha tenido un extenso uso en agricultura. Aunque la venta y el uso de plaguicidas que contienen mercurio para fines fitosanitarios han sido prohibido en un gran número de países, se siguen permitiendo determinadas aplicaciones. Así en Australia se permite el uso de un fungicida con cloruro de metoxietilmercurio para eliminar el hongo *Ceratocystys paradoxa* de la caña de azúcar (Wickramasinghe *et al.*, 2015).

Desde la antigüedad, el mercurio también ha sido empleado con fines medicinales. Las civilizaciones griega, romana y orientales lo empleaban con el fin de prolongar la vida, curar fracturas y conservar la buena salud. También se utilizaba en cosméticos y ungüentos para enfermedades cutáneas. En los siglos XIX y principios del XX se describe su empleo como antihelmíntico y como terapia para el tratamiento de la sífilis, la fiebre amarilla y el tifus. Hasta la década de los setenta del siglo XX se utilizaron como diuréticos compuestos orgánicos sintéticos con un 30-40% de mercurio. En la actualidad algunos fármacos siguen conteniendo mercurio en su composición, en forma principalmente de tiomersal o acetato de fenilmercurio, los cuales se adicionan como conservantes. Este es el caso de algunas formulaciones oftalmológicas, óticas, nasales, antihemorroidales, antivirales, antimicóticos, antibióticos y ciertas vacunas (Ball *et al.*, 2001;

Rothstein *et al.*, 2003). Las amalgamas dentales también pueden contener mercurio (45-55%) junto a plata (30%) y otros metales (cobre, zinc).

3. FUENTES DE EMISIÓN DE MERCURIO

La concentración media de mercurio en la corteza terrestre se estima en 80 µg/kg (OMS, 2003). El contenido en la atmósfera es muy superior, se cifra entre 5500 y 8900 toneladas, consecuencia de emisiones naturales y antropogénicas (UNEP, 2013). El metal se libera a través de la erosión de las rocas y como resultado de las actividades volcánicas. Además, el mercurio oxidado depositado se puede reducir y volver a la atmósfera. La reemisión de mercurio ocurre desde el suelo, la vegetación y la superficie del mar, y se considera significativa en comparación con las fuentes primarias (UNEP, 2008). Algunos modelos recientes sobre el flujo de mercurio en el medioambiente sugieren que las fuentes naturales de origen geológico representan un 10% del mercurio que llega a la atmósfera (UNEP, 2013), mientras que el porcentaje de emisiones de origen antropogénico es de aproximadamente un 75% (Barkay *et al.*, 2003).

Como resultado de las emisiones antropogénicas, la tasa global de deposición de mercurio atmosférico es aproximadamente tres veces mayor que en los tiempos previos a la industrialización y ha aumentado en un factor de 2 a 10 en las regiones más industrializadas (Hylander y Meili, 2003). Se estima que en el año 2005 se alcanzaron las 1921 toneladas (UNEP, 2013). Estas emisiones han sido diferenciadas en “no intencionales” e “intencionales”. En las emisiones “no intencionales” el mercurio es un subproducto del proceso productivo dada la presencia de este elemento en materias primas y combustibles fósiles. Los sectores productivos en los que se generan este tipo de emisiones son el refinado de petróleo crudo, ignición de combustibles fósiles en las centrales eléctricas, la calefacción residencial y la producción de metales no ferrosos, de cemento y de oro a gran

escala (UNEP, 2010). Las emisiones “intencionales” están relacionados con los usos que el hombre ha dado a este elemento como la minería de oro artesanal y en pequeña escala, los procesos de incineración de residuos, especialmente de origen médico, y la manufactura y reparación de equipos eléctricos y científicos (UNEP, 2010). La tabla 2 muestra la contribución de diversos sectores a las emisiones antropogénicas de mercurio a la atmósfera (Pirrone *et al.*, 2010).

Fuentes	Emisiones (toneladas de mercurio/año)
Combustión de carbón y petróleo	810
Producción de metales no ferrosos	310
Producción de cemento	236
Actividad minera artesanal	200
Eliminación de residuos	187
Producción de sosa cáustica	163
Producción de mercurio	50
Producción de arrabio y acero	43
Ignición de combustibles fósiles	32
Producción de monómero de cloruro de vinilo	24
Otros	65
TOTAL	2320

Tabla 2. Emisiones antropogénicas mundiales de mercurio a la atmósfera procedentes de diversos sectores (Pirrone *et al.*, 2010).

En las últimas décadas se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva encaminada a precisar los inventarios nacionales de emisiones de mercurio. Según los datos disponibles, las mayores regiones emisoras en 2005 fueron Asia, América

del Norte y Europa. Las emisiones asiáticas fueron cuatro veces superiores a las emisiones combinadas de América del Norte y Europa (UNEP, 2008). La emisión en Europa, 205 toneladas/año (valor reportado en 2005), procedió principalmente de combustiones estacionarias (52%) (Pirrone *et al.*, 2010). Los países que emiten una mayor cantidad de mercurio a la atmósfera, teniendo en cuenta los datos publicados en los años 2003-2005, son China (609 toneladas/año), India (241 toneladas/año) y Rusia (70 toneladas/año) (Pirrone *et al.*, 2010). En conjunto, estos tres países liberan más del 50% del mercurio antropogénico mundial. Desde hace años, existe una preocupación creciente de los organismos reguladores por los niveles de mercurio en el medio ambiente y sus consecuencias para la salud. Como ejemplo, la Unión Europea elaboró en el año 2005 una estrategia destinada a reducir las cantidades de mercurio en la UE y en el mundo, su circulación y la exposición de las poblaciones a este metal (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005). Entre los objetivos de esta medida se encontraban: reducir las emisiones de mercurio, restringir la oferta y la demanda de esta sustancia y gestionar las cantidades de mercurio ya almacenadas, así como las presentes en los productos. La UE ha elaborado directivas limitando o reduciendo el uso de mercurio en productos (Directiva 2005/32/CE; Directiva 2006/66/CE) o procesos industriales (Directiva 2010/75/UE). Desde el año 2014 se ha prohibido la comercialización de tensiómetros, barómetros, higrómetros, manómetros, esfigmomanómetros y termómetros que contengan mercurio y estén destinados a usos profesionales e industriales (Reglamento 847/2012).

4. CICLO DEL MERCURIO

El ciclo biogeoquímico del mercurio en el medio ambiente se muestra en la figura 1. Los procesos bióticos y abióticos facilitan la circulación de mercurio desde los suelos y el agua a la atmósfera, y de ésta nuevamente a la superficie terrestre a

través de deposiciones tanto húmedas como secas. El mercurio elemental, procedente de fuentes naturales o antropogénicas, pasa a la atmósfera donde presenta un tiempo de residencia de uno a dos años. Su oxidación a Hg(II) por reacción con oxidantes de la atmósfera permite su deposición en la corteza terrestre donde su tiempo de residencia varía entre horas y meses. En los suelos, las condiciones de pH, temperatura y la composición favorecen la formación de compuestos inorgánicos de Hg(II), los cuales suelen formar complejos con la materia orgánica y las arcillas, haciendo que los suelos actúen como grandes reservorios de mercurio (Watras y Huckabee, 1994). La acción sobre el Hg(II) de la microbiota del suelo da lugar a una pequeña cantidad de metilmercurio cuya proporción media suele ser inferior al 1%. El metilmercurio presenta una gran afinidad por la materia orgánica, hecho que también limita su movilidad en el suelo.

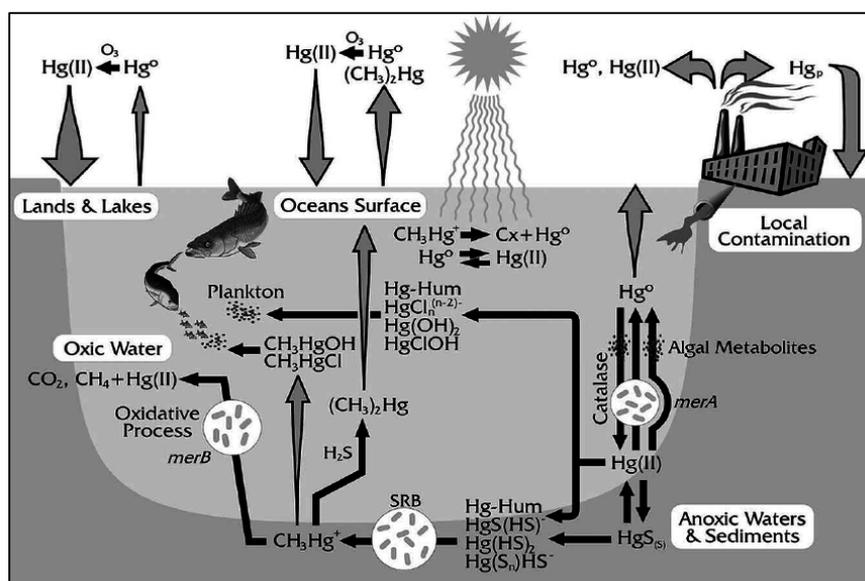


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio (Barkay *et al.*, 2003).

Una parte del Hg(II) presente en el suelo y la atmósfera llega a las cuencas hidrográficas. En el agua experimenta procesos de metilación por la acción de microorganismos, principalmente bacterias anaerobias reductoras de sulfuro (King *et al.*, 2000). Además de esta transformación biótica, existe una creciente evidencia de que las reacciones químicas representan otra vía de metilación del mercurio en el medio acuático. Los compuestos que se cree causan la metilación abiótica incluyen moléculas orgánicas pequeñas, tales como yoduro de metilo y sulfuro de dimetilo, y componentes orgánicos de mayor tamaño procedentes de materia orgánica disuelta tales como ácidos fúlvicos y húmicos (Celo *et al.*, 2006). Esta metilación genera compuestos orgánicos, entre ellos el dimetilmercurio, especie volátil que se recicla a la atmósfera, y el metilmercurio que se acumula en el plancton. El metilmercurio se biomagnifica en la cadena alimentaria marina, de ahí que los mayores contenidos de esta especie se hallen en animales marinos de gran tamaño. Por otra parte, el metal disuelto en el agua puede evaporarse y retornar a la atmósfera.

5. FUENTES DIETARIAS DE MERCURIO

La exposición a mercurio se produce principalmente a través del agua de bebida y los alimentos. En aguas de áreas no influenciadas por la industrialización, la concentración media de mercurio es de 25 ng/L (OMS, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un límite de 1000 ng/L de mercurio total en agua destinada al consumo humano (OMS, 2008).

La principal fuente dietaria de mercurio para la mayoría de la población son los alimentos, donde el metal se encuentra principalmente en forma inorgánica divalente [Hg(II)] o como metilmercurio (CH₃Hg). Los pescados considerados grandes depredadores marinos (pez espada, tiburón, bonito y atún, entre otros) son los principales contribuidores a esta ingesta de mercurio. En estos alimentos, el

metilmercurio constituye la especie mayoritaria ($\geq 80\%$) (Storelli *et al.*, 2002, 2003; Sahuquillo *et al.*, 2007). Las concentraciones de mercurio reportadas en pez espada (0,031-4,9 mg/kg), atún (0,60-1,47 mg/kg) y tiburón (0,22-2,5 mg/kg) (Monteiro y Lopes, 1990; Branco *et al.*, 2007; Torres Escribano *et al.*, 2011) son en ocasiones superiores a los límites establecidos. Según indica el informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre mercurio en alimentos (EFSA, 2012), un 5% de los productos de la pesca superan 1 mg/kg, límite máximo de mercurio admitido por la legislación europea (Reglamento 420/2011). Los productos procesados derivados de los grandes depredadores presentan en general, concentraciones inferiores del metal (0,003-1 mg/kg) (Burger y Gochfeld, 2004; Yang *et al.*, 2015).

En productos de origen terrestre, las concentraciones de mercurio son inferiores; oscilan entre 0,0001 y 0,050 mg/kg, siendo los contenidos en la mayoría de las muestras analizadas inferiores al límite de cuantificación de la metodología utilizada. En estos productos predomina la forma inorgánica divalente (Cappon, 1981; Jedrzejczak, 2002). Algunas especies de setas constituyen una excepción, mostrando concentraciones similares o incluso superiores a las presentes en grandes depredadores marinos. Las setas tienen capacidad de bioacumular mercurio desde el suelo con factores de bioconcentración que oscilan entre 2 y 210 (Falandysz *et al.*, 2014). En Europa no limita el contenido máximo de mercurio en setas. China tiene legislación al respecto; 0,1 mg/kg peso fresco (pf), equivalente a 1 mg/kg peso seco (ps) (China's Ministry of Health, 2012). En la zona meridional de España se han encontrado setas de la especie *Boletus aereus* con elevadas concentraciones de mercurio ($10,3 \pm 2,6$ mg/kg ps) (Ostos *et al.*, 2015). Kalač y Svoboda (2000) también muestran valores elevados (> 1 mg/kg ps) en muestras de los géneros *Boletus*, *Agaricus*, *Lepista* y *Macrolepiota*, siendo especialmente notables los contenidos de *Lepista nuda* y *Agaricus arvensis* que pueden alcanzar 20 mg/kg ps.

En ocasiones, los procesos previos al consumo del producto (lavado, pelado, envasado, cocinado) pueden reducir la cantidad del metal que finalmente se ingiere con una determinada matriz alimentaria, disminuyendo de esta forma el riesgo asociado a su consumo. Los estudios realizados sobre el efecto del cocinado indican que, en general, este proceso no afecta de forma relevante la concentración de mercurio. Morgan *et al.* (1997) muestran que los tratamientos más habituales (fritura, horneado y hervido), suponen un ligero aumento de los contenidos totales de mercurio (1,1 – 1,8 veces), que según los autores es causado por una pérdida de peso (agua y grasa). Un estudio reciente de Schmidt *et al.* (2015) indica que el tratamiento culinario tampoco afecta la forma química del mercurio presente inicialmente en el pescado crudo.

También se ha evaluado el efecto del proceso de enlatado sobre los contenidos de mercurio. Rasmussen y Morrissey (2007) ponen de manifiesto que las concentraciones medias de mercurio en las muestras de atún blanco varían entre 0,09 y 0,24 mg/kg, mientras que el contenido después del enlatado oscila entre 0,10 y 0,33 mg/kg, indicando que durante el proceso de envasado no hay cambios relevantes en la concentración de mercurio. Burguer y Gochfeld (2004) muestran que el líquido de gobierno de las conservas de pescado no contiene cantidades destacables de mercurio, lo que confirma que no hay una solubilización del mercurio desde el alimento durante el procesado.

6. EXPOSICIÓN DIETARIA A MERCURIO

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha establecido una ingesta semanal tolerable (IST) de 3 µg/kg peso corporal (pc) para mercurio inorgánico (JECFA, 2011) y de 1.6 µg/kg pc para el metilmercurio (JECFA, 2003).

EFSA ha reportado la ingesta de mercurio total a través de los productos pesqueros de la población europea. Las medias nacionales de exposición oscilan entre 1,3 (Países Bajos) y 97,3 $\mu\text{g}/\text{semana}$ (Portugal), lo que corresponde a un rango de $<0,1-1,6 \mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{semana}$ (para un adulto de 60 kg de peso) (EFSA, 2004). Mahaffey *et al.* (2004) evalúan la ingesta de metilmercurio de 1709 mujeres estadounidenses a partir de los datos de consumo obtenidos por recordatorios de 30 días y registros de 24 horas, utilizando una concentración promedio de metilmercurio para cada especie de pescado y marisco. Los autores estiman una ingesta media de $0,14 \mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{semana}$, muy inferior a la máxima recomendada por JECFA. Dabeka *et al.* (2003) muestran una ingesta media semanal similar en la población canadiense ($0,154 \mu\text{g}/\text{kg pc}$). La ingesta semanal de la población japonesa es superior; oscila entre $0,38$ y $6,79 \mu\text{g}/\text{kg pc}$, debido posiblemente al elevado consumo de productos pesqueros, entre los que destacan grandes depredadores marinos como el tiburón (Iwasaki *et al.*, 2003).

En el último informe de EFSA se indica el riesgo que puede presentar la ingesta de productos pesqueros para determinados grupos poblacionales en Europa, ya que el percentil 95 de las exposiciones semanales a mercurio a través de estos alimentos está próximo o supera el IST en todos los grupos etarios, y los consumidores frecuentes de productos pesqueros pueden llegar a exceder ampliamente, hasta 6 veces, este valor de referencia (EFSA, 2012). El problema se acrecienta en zonas donde existe contaminación por mercurio. Este es el caso de las comunidades Inuit que viven en el Ártico oriental, zona con una importante actividad minera. Los distintos grupos etarios estudiados presentan una ingesta de metilmercurio ($6,3-8,0 \mu\text{g}/\text{pc}/\text{semana}$) que supera ampliamente la recomendada por JECFA, siendo los productos pesqueros locales los máximos contribuidores a esta ingesta (Chan *et al.*, 1995). En Colombia, la contaminación de las cuencas hidrográficas de los ríos Cauca, Magdalena y Caqueta por actividad minera, genera una problemática medioambiental y de salud pública. Estas poblaciones consumen en muchas

ocasiones agua de fuentes superficiales o subterráneas sin tratamiento de potabilización, con el consiguiente riesgo de que contengan mercurio. Por otra parte, el pescado es su principal fuente de proteínas y es consumido diariamente por una gran parte de la población. Estos pescados de origen local presentan elevadas concentraciones de mercurio, reflejo de la contaminación medioambiental existente (Calao y Marrugo, 2015; Olivero-Verbel *et al.*, 2016).

Las agencias de salud y seguridad alimentaria de varios países han emitido recomendaciones para limitar el consumo de ciertos tipos de productos pesqueros en poblaciones susceptibles (FSA, 2003; Health Canada, 2008; AECOSAN, 2011). Así, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) recomienda evitar el consumo de pez espada, tiburón, atún rojo y lucio a mujeres en edad fértil, embarazadas o en periodo de lactancia y a niños menores de 3 años. Asimismo, recomienda limitar a 50 g/semana el consumo de estos productos pesqueros en niños de 3 a 12 años (AECOSAN, 2011).

Se han llevado a cabo algunos estudios para intentar evaluar el riesgo asociado a un consumo regular de productos pesqueros mediante la medición de biomarcadores de exposición tales como el contenido de mercurio en pelo y sangre. Brune *et al.* (1991), tras revisar los estudios de poblaciones expuestas a mercurio a través de diversas fuentes, reportan que los valores más elevados de estos biomarcadores se encuentran entre los consumidores de pescado de Groenlandia y Japón. Sheehan *et al.* (2014), también en una revisión de 164 estudios sobre la exposición a mercurio en mujeres y sus bebés, evidencian que los valores más elevados de mercurio en los biomarcadores se presentan en poblaciones con dietas basadas en productos pesqueros, principalmente poblaciones ribereñas tropicales cercanas a mineras de oro y poblaciones indígenas del Ártico. Estos autores también destacan los valores de mercurio en los biomarcadores de poblaciones costeras del Asia sudoriental, el Pacífico occidental y el Mediterráneo, cuyo

promedio se aproxima a los valores de referencia propuestos por la OMS (1 mg/kg en pelo; 15 µg/L en sangre).

Los contenidos elevados en biomarcadores, sin embargo, no siempre se correlacionan con efectos sobre la salud. Una revisión reciente sobre la relación entre la exposición a mercurio a través de la dieta y la mayor prevalencia de patologías cardiovasculares y de desarrollo neurológico indica que los datos existentes no son concluyentes. Los autores sugieren que esta falta de correlación se debe a que no se tiene en cuenta otros compuestos presentes en el alimento que pueden ser beneficiosos y que pudieran contrarrestar los efectos tóxicos del mercurio, tales como el selenio (Se), la vitamina E y los ácidos grasos polinsaturados (Choi *et al.*, 2008) (sección 7.5).

7. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A MERCURIO

La toxicidad del mercurio depende de la forma química en la que se encuentre, la dosis, la edad, los hábitos dietéticos, así como de la duración y la vía de exposición. Los efectos más reportados para el metilmercurio se producen a nivel neurológico y a nivel renal para el mercurio inorgánico.

7.1. Efectos carcinogénicos

Un estudio de exposición crónica a mercurio inorgánico en ratas y ratones dosificados con HgCl₂ (2,5-10 mg/kg) durante 102-103 días, mostró un incremento de tumores de tiroides y preestómago en ratas y de tumores renales en ratones (NTP, 1993). Teniendo en cuenta este estudio, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA) ha clasificado el cloruro de mercurio como posible cancerígeno (grupo C; U.S. EPA; 1999); sin embargo, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) lo clasifica como no cancerígeno (IARC,

1993), ya que considera que el estudio presenta una elevada mortalidad y, por tanto, no constituye una base suficientemente robusta para la obtención de conclusiones.

Por lo que respecta al metilmercurio, está clasificado por la IARC (1993) como posible cancerígeno para el hombre. No existen estudios epidemiológicos que asocien su exposición con una prevalencia de procesos cancerígenos en humanos. En ratones expuestos a metilmercurio (30 mg/L) durante 78 semanas se observaron tumores renales (Mitsumori *et al.*, 1981). Un estudio posterior realizado durante 2 años empleando concentraciones inferiores (0,4 mg/L; 2 mg/L; 10 mg/L), evidenció una mayor incidencia de adenomas y/o carcinomas renales en ratones expuestos a 10 mg/L (Mitsumori *et al.*, 1990).

7.2. Efectos sobre el sistema nervioso y el desarrollo

Este efecto se puso de manifiesto por primera vez en los casos de intoxicación por consumo de pescado contaminado que tuvieron lugar en la bahía de Minamata. Una planta productora de acetaldehído vertió entre 1932 y 1968 aproximadamente 27 toneladas de residuos de mercurio a la bahía. Los signos clínicos más comunes entre la población adulta fueron parestesia, ataxia, temblores, pérdidas auditivas y dificultad al andar. El examen del cerebro de los individuos fallecidos evidenció atrofia, lesiones en el córtex cerebral y cerebelar y cambios en las fibras nerviosas (Harada, 1995). Este desastre afectó de forma muy destacable a la población infantil y a los niños nacidos de madres afectadas. Los recién nacidos presentaban malformaciones, retrasos en el desarrollo físico y trastornos a corto y largo plazo del sistema nervioso central. Se reportaron distintas afecciones neurales tales como parálisis, retraso mental, ataxia cerebelosa, disartria y reducción del campo visual entre otros (Harada, 1995).

El otro gran desastre que confirmó el efecto neurotóxico del metilmercurio durante el desarrollo fue el que se produjo en Irak a principios de 1970, debido al

consumo de semillas de trigo y cebada importadas desde México y EEUU. Los granos importados habían sido tratados con metilmercurio y la advertencia en cada saco sobre la prohibición de utilizar estos granos como alimentos estaba rotulada en inglés y en castellano. Los granos fueron distribuidos entre los agricultores quienes, ante el apremio de la hambruna debido al período de sequía que había sufrido el país, utilizaron parte para preparar alimentos. Tres meses después de haberse iniciado la distribución, los casos de envenenamiento seguido de muerte se multiplicaron en el interior del país. La población infantil expuesta *in utero* desarrolló un cuadro neurotóxico con defectos sensoriales severos como ceguera o sordera, reflejos hiperactivos, parálisis cerebral y retraso mental (Amin-Zaki *et al.*, 1974).

Las evidencias sobre su efecto neurotóxico, sin embargo, no son tan obvias cuando se trata de poblaciones con un menor índice de exposición. Se han realizado tres grandes estudios epidemiológicos prospectivos en las Islas Seychelles, Nueva Zelanda y las Islas Faroe para evaluar el desarrollo en la infancia y la neurotoxicidad en relación con la exposición fetal a metilmercurio en poblaciones consumidoras de pescado. No se reportaron efectos adversos en el estudio de las Islas Seychelles, pero los niños de las Islas Faroe mostraron déficits sutiles de memoria, atención y lenguaje a los 7 años de edad. En el estudio de Nueva Zelanda, los niños de 4 a 6 años también exhibieron deficiencias en una serie de pruebas neuropsicológicas (U.S. EPA, 2001). En un artículo reciente de Grandjean y Herz (2011) se discuten estos estudios y se indica que hay demasiadas incertidumbres en los mismos como para confirmar la relación directa entre la exposición prenatal a metilmercurio a través de los alimentos y la prevalencia de estas patologías en la población infantil.

También se han descrito efectos sobre el sistema nervioso de la forma inorgánica y la elemental en animales de laboratorio (IPCS, 2003). Además, para el mercurio elemental se ha evidenciado que la exposición *in utero* por inhalación afecta al

sistema nervioso central. La exposición de ratas durante la gestación produce en la descendencia afecciones del comportamiento instintivo y del aprendido, con manifestaciones tales como hiperactividad, déficit del aprendizaje espacial y del comportamiento adaptado (Fredriksson *et al.*, 1992, 1996).

7.3. Efectos sobre el sistema renal

Se ha puesto de manifiesto que la exposición a mercurio inorgánico conlleva importantes afecciones renales, debido a que este órgano acumula una cantidad muy importante de esta forma mercurial. Exposiciones de roedores a HgCl₂ a medio y largo plazo conllevan incrementos del peso de los riñones (Jonker *et al.*, 1993; NTP, 1993). Este incremento responde a un aumento en la incidencia de vacuolización del epitelio tubular (NTP, 1993). Los estudios a largo plazo en ratas (2 años, dosificaciones 5 días/semana, concentraciones entre 0,3-5 mg/kg pc/día) muestran una alta incidencia de nefropatías que cursan con regeneración tubular, engrosamiento de la membrana basal del túbulo y túbulos dilatados con cilindros hialinos (NTP, 1993). Tal y como se ha comentado en el apartado 7.1, en roedores expuestos crónicamente a mercurio inorgánico se ha puesto de manifiesto una tendencia al incremento de tumores malignos en el túbulo renal, la cual aumenta con la dosis. En humanos, la exposición crónica da lugar a disfunciones renales que pueden manifestarse de distintas formas, desde proteinurias asintomáticas hasta oligonurias o anurias y síndromes nefríticos. Holmes *et al.* (2009) indican que los cambios en la función renal son detectables a concentraciones urinarias de mercurio superiores a 5 µg/g creatinina.

También se han reportado efectos sobre el sistema renal del metilmercurio en roedores expuestos durante tiempos prolongados. Así, ratas expuestas 26 días a concentraciones de 0,25 mg/kg/día muestran afecciones renales severas (U.S. EPA, 2001). Asimismo, se ha mostrado un aumento de la incidencia de tumores sólidos

renales en ratones expuestos durante 103 días a 10 mg/L de metilmercurio (Mitsumori *et al.*, 1990). Los efectos renales observados en animales no se han puesto de manifiesto en humanos (JECFA, 2000).

7.4. Mecanismos de acción

Los mecanismos moleculares implicados en la toxicidad del mercurio inorgánico y el metilmercurio están muy relacionados con su alta afinidad por moléculas que presentan grupos tiol (proteínas o péptidos), ya que esta unión convierte a estas moléculas en susceptibles de ser modificadas estructural y funcionalmente. Por otro lado, algunos estudios apuntan a que el mercurio puede afectar la expresión de numerosos genes relacionados con el control y regulación del ciclo celular, factores de transcripción, componentes de la maquinaria de reparación del ADN y determinadas rutas de señalización (Ayensu y Tchounwou, 2006). El efecto sobre la expresión génica y su elevada capacidad para interaccionar con los grupos tiol de numerosas moléculas pueden ser la base molecular de los procesos celulares implicados en la toxicidad del mercurio, tales como la inducción de estrés oxidativo, afección de la homeostasis del calcio y de la biosíntesis de grupos hemo, modificaciones del citoesqueleto, perturbaciones a nivel de membrana y alteraciones de la respuesta inmune.

7.5. Modulación del efecto tóxico del mercurio mediante la dieta

Se ha puesto de manifiesto que algunos componentes de la dieta pueden modular el efecto tóxico del mercurio. En animales, se ha evidenciado que el ratio dietario selenio/mercurio es una variable importante en el riesgo asociado a la exposición a metilmercurio (Fredriksson *et al.*, 1993; Ralston *et al.*, 2007). Esta especie mercurial es un fuerte inhibidor de las enzimas dependientes de selenio, que son necesarias para prevenir y revertir el daño oxidativo. La inhibición de las

actividades de las selenoenzimas parece ser una de las principales causas de la toxicidad asociada al metilmercurio (Ralston y Raymond, 2010). Un exceso de selenio respecto a mercurio en la dieta reduce esta inhibición enzimática, al permitir que exista selenio disponible para la síntesis de selenoenzimas. Aunque la mayor parte de los estudios hacen referencia al efecto protector del selenio inorgánico, también se ha evidenciado este papel para el selenio orgánico, que es el mayoritario en alimentos. Sakamoto *et al.* (2013) demuestran el efecto protector de la selenometionina frente a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio en ratas en desarrollo. Otro elemento estudiado como posible protector de la toxicidad, en este caso sólo del Hg(II), ha sido el zinc (Fukino *et al.*, 1984; Peixoto *et al.*, 2003; Franciscato *et al.*, 2011). Este antagonismo se relaciona con la síntesis de metalotioneínas y con la participación del zinc en la maquinaria antioxidante de la célula (Fukino *et al.*, 1984, 1986; Peixoto *et al.*, 2003).

Algunas vitaminas también se han apuntado como antagonistas del efecto tóxico del mercurio. En un estudio realizado en ratas tratadas con metilmercurio (2,0 mg/kg pc/día) o con una combinación de metilmercurio y vitamina E (50 mg/kg pc/día), los animales tratados con mercurio presentaron cambios morfológicos en los cuerpos neuronales y en las fibras de la raíz dorsal, mientras que en los animales tratados con metilmercurio y vitamina E no se observaron efectos negativos (Yip y Chang, 1982). La vitamina C también se ha mostrado efectiva en la protección frente a la toxicidad del mercurio. En ratones tratados con HgCl₂ (65 mg/L) durante 28 días a través del agua de bebida se observaron descensos de los parámetros hematológicos, un aumento de las enzimas hepáticas y lesiones en hígado y riñones. Todos estos efectos tóxicos se redujeron en presencia de vitamina C (250 mg) o vitamina E (100 mg/L), si bien la combinación de ambas fue el tratamiento más efectivo (Huq *et al.*, 2008). La combinación de vitamina C y ácido fólico también mostró un efecto antagonista en embriones de pollo tratados con metilmercurio (2,5

mg), reduciendo en gran medida los efectos teratogénicos observados al inyectar la forma mercurial a los huevos fertilizados (Bekhet *et al.*, 2013).

Existen también estudios relacionados con suplementos o extractos naturales que aminoran la toxicidad del mercurio. Se ha demostrado un efecto protector de la cianobacteria *Spirulina platensis* sobre el daño oxidativo y las alteraciones histopatológicas observadas en los testículos de ratas tratadas con Hg(II) (El-Desoky *et al.*, 2013). Los extractos acuosos de *Ocimum sanctum* (Sharma *et al.*, 2002), *Ginkgo biloba L.* (Sener *et al.*, 2007) y *Bacopa monniera* (Sumathi *et al.*, 2012) han sido empleados en la reducción del daño oxidativo producido por Hg(II) o metilmercurio en roedores.

8. TOXICOCINÉTICA

Los procesos que experimenta el mercurio desde su ingreso en el organismo por vía oral hasta su eliminación dependen de la forma química en la que se encuentre, de la dosis, de factores propios del individuo (edad, sexo, masa corporal, microbiota intestinal, estado de nutrición y enfermedades preexistentes, entre otros) y de los componentes de la dieta.

8.1. Absorción

Los estudios en animales y humanos han mostrado que el metilmercurio se absorbe con mayor eficacia que el mercurio inorgánico. Sasser *et al.* (1978), empleando segmentos ligados de intestino de rata, evidencian que la absorción de la forma orgánica es 17 a 35 veces mayor que la observada para la forma inorgánica. En monos (Berlin *et al.*, 1975) y ratas (Walsh, 1982) se ha observado una absorción casi completa del metilmercurio administrado ($\geq 95\%$). Piotrowski *et al.* (1992) evidencian que la retención de HgCl₂ 4 h después de la exposición varía según la

dosis administrada, aunque siempre es baja. Así para dosis de mercurio bajas o moderadas (0,2-12,5 mg/kg pc), la retención es del 3-4%, mientras que para dosis altas (17,5 y 20,0 mg/kg pc), la retención es de 7-9%. Los estudios anteriormente citados se han realizado dosificando a los animales con soluciones acuosas de patrones vía intragástrica.

Los estudios sobre la absorción del mercurio ingerido con los alimentos son muy escasos y ponen de manifiesto una tendencia similar a los patrones acuosos, una mayor absorción de la forma orgánica. Endo *et al.* (2003) investigan en ratas Wistar la absorción, distribución y excreción de mercurio tras una única administración oral de hígado de ballena altamente contaminado con mercurio en forma inorgánica (1980 mg/kg). Los resultados muestran que alrededor del 95% de la dosis se excreta en heces y menos del 0,05% en orina. Basándose en esta excreción, los autores estiman que la tasa de absorción de mercurio es de un 5%. Sin embargo, hay que indicar que esta deducción no es del todo precisa ya que los valores de excreción fecal tienden a subestimar la tasa de absorción al no distinguir entre el mercurio no absorbido y el eliminado al intestino tras una recirculación enterohepática. Yannai y Sachs (1993) muestran que la absorción del mercurio presente en pescado, en su mayoría metilmercurio, es elevada (75-93%). A diferencia de lo reportado por otros estudios, estos autores muestran una absorción moderada del mercurio inorgánico (48%) tras la dosificación de maíz contaminado con esta forma mercurial durante su cultivo.

Se ha sugerido que la absorción intestinal de Hg(II) en ratas transcurre en dos etapas. Inicialmente se acumula en la mucosa intestinal y posteriormente se internaliza para llegar a la circulación sistémica (Piotrowski *et al.*, 1992). Los estudios sobre absorción intestinal de Hg(II) *in situ* han evidenciado que el transporte se modifica con el pH, las concentraciones de Cl⁻ y Na⁺ y en presencia de sustancias quelantes y cisteína (Endo *et al.*, 1988, 1991). En un estudio *in vitro*

empleando la línea celular Caco-2, Vázquez *et al.* (2015a) demuestran que la difusión paracelular y la vía transcelular pasiva no son importantes en el transporte de Hg(II). Además, ponen de manifiesto que el transporte transcelular presenta un componente activo, es dependiente del pH y de la concentración de Na⁺ y se inhibe en presencia de aminoácidos catiónicos y neutros y Mn(II). Estos mismos autores demuestran que el transporte de Hg(II) unido a cisteína se puede producir a través del transportador de aminoácidos b⁰⁺ (Vázquez *et al.*, 2015b) y que el paso a través de la monocapa epitelial de Hg(II) en forma salina puede estar mediado por el transportador DMT1 (figura 2) (Vázquez *et al.*, 2015c), principal transportador intestinal del hierro no-hemo y otros cationes divalentes (Bannon *et al.*, 2002).

En relación al metilmercurio, Vázquez *et al.* (2014a) muestran que la principal vía de entrada cuando está en forma de sal de cloruro es por difusión pasiva transcelular, hecho que concuerda con su carácter lipofílico. Sin embargo, cuando está unido a cisteína la participación de la difusión pasiva no es relevante. Recientemente, estos autores (Vázquez *et al.*, 2015b) han demostrado, mediante estudios de silenciamiento génico, que el sistema B⁰⁺ participa en la entrada al interior del epitelio intestinal del complejo metilmercurio-cisteína (figura 2). Mori *et al.* (2012) sugieren también una participación de algún miembro de la familia de transportadores LAT en la captación por parte de células epiteliales del intestino.

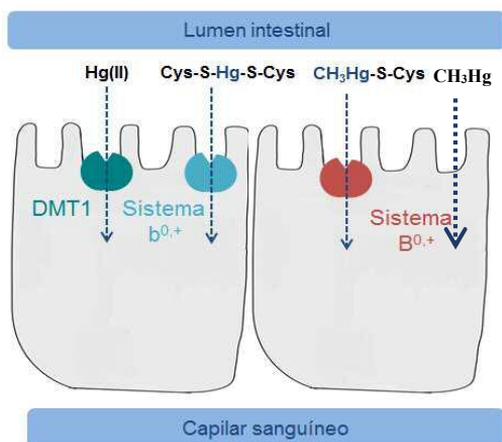


Figura 2. Mecanismos de transporte de las formas mercuriales en enterocitos (Vázquez, 2014b).

8.2. Distribución

El mercurio inorgánico absorbido se distribuye en sangre a partes iguales entre el plasma y los eritrocitos (Clarkson *et al.*, 2007). Su paso a través de la barrera placentaria y hematoencefálica es limitado (Clarkson *et al.*, 2007). El riñón es el órgano que presenta una mayor acumulación de la forma inorgánica de mercurio (Zalups, 2000). También se han descrito concentraciones elevadas en la zona periportal del hígado, la mucosa intestinal, el epitelio de la piel, las células intersticiales de los testículos y el plexo coroideo de animales expuestos (EFSA, 2012).

En cuanto al metilmercurio, tras su absorción pasa a sangre donde se acumula preferentemente en los eritrocitos. En el plasma, la mayoría del metilmercurio está unido a la albúmina, que tiene un grupo tiol libre en un residuo cisteinil terminal (Yasutake *et al.*, 1990). El metilmercurio es capaz de atravesar el folículo piloso, la placenta y la barrera hematoencefálica, permitiendo su acumulación en el

cabello, el feto y el cerebro (Clarkson y Magos, 2006). Las concentraciones más elevadas tras la exposición se encuentran en riñón e hígado (NRC, 2000).

8.3. Metabolismo

La biotransformación que experimenta el mercurio inorgánico se limita prácticamente a las reacciones de conjugación con grupos tiol (JECFA, 2011). En estudios con ratones se ha evidenciado que una pequeña cantidad del mercurio inorgánico puede ser reducido a mercurio elemental y eliminado como vapor de mercurio (EFSA, 2012). No hay evidencias de la formación de especies metiladas a partir de formas inorgánicas en tejidos animales o humanos.

El metilmercurio es demetilado en mamíferos a mercurio inorgánico en presencia de especies reactivas de oxígeno. Este proceso metabólico se ha descrito en el hígado, tracto intestinal, bazo y en menor medida en células fagocitarias y en el cerebro (EFSA, 2012). Además, la microbiota presente en el intestino grueso es un factor determinante en las transformaciones que experimenta esta especie mercurial (Diaz-Bone y Van de Wiele, 2010). Rowland *et al.* (1978) evidenciaron que el contenido de ciego e intestino delgado de ratas metabolizaba CH_3HgCl a un producto volátil tras un período de incubación de 3 a 4 días. Estos autores confirmaron que la volatilización era debida a la microbiota, principalmente la aislada del ciego. Varios estudios han evidenciado que los animales sin microbiota intestinal muestran una menor excreción intestinal de metilmercurio (Seko *et al.*, 1981; Rowland *et al.*, 1984). Esta reducción de la excreción ha sido relacionada con una disminución de la demetilación de la forma orgánica a mercurio inorgánico por parte de la microbiota intestinal. La demetilación fue constatada por Rowland *et al.* (1977) empleando los contenidos de ciego de rata, quienes demostraron *in vitro* la síntesis de HgCl_2 a partir de CH_3HgCl bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Asimismo, evidenciaron que la síntesis se inhibía en presencia de

antibióticos y por filtración del contenido cecal. El proceso contrario también se ha observado en aislados de microbiota intestinal; así, un estudio realizado por Ludwicki (1990) mostró que la incubación del contenido intestinal de ratas con HgCl_2 (2,5-12 $\mu\text{g/mL}$) producía dos reacciones, una metilación minoritaria a metilmercurio y una demetilación a mercurio elemental.

8.4. Excreción

La mayoría del mercurio se excreta vía fecal y urinaria. La magnitud de estas vías de excreción depende principalmente de la dosis ingerida y de la especie química. La eliminación también ocurre a través de las glándulas sudoríparas, mamarias y lagrimales, aunque en menor proporción.

La vida media biológica del mercurio inorgánico en humanos es de aproximadamente 40 días (Kolev y Bates, 2005). Debido a su baja absorción intestinal se elimina principalmente por heces (JECFA, 2011). Estudios en voluntarios han puesto de manifiesto que, tras la ingesta de mercurio inorgánico, aproximadamente el 85% se excreta en heces en los primeros días (Miettinen, 1973). En cuanto al mercurio inorgánico absorbido, se excreta principalmente por orina, aunque también existe una cierta eliminación vía biliar en forma de complejos con el glutatión (GSH).

La vida media biológica de metilmercurio en humanos es de 70-80 días (Miettinen *et al.*, 1971). Aproximadamente el 80-90% de la dosis absorbida es eliminada a través de las heces en forma de mercurio inorgánico (NRC, 2000). La eliminación urinaria es relativamente baja, pero aumenta gradualmente con el tiempo, pudiendo llegar a representar un porcentaje importante de la excreción diaria (20% tras 100 días; U.S. EPA, 2001). La eliminación vía biliar juega un papel muy importante en el proceso de excreción del metilmercurio absorbido. En el hígado, el metilmercurio se conjuga con moléculas de GSH, al igual que ocurre con

la forma inorgánica, y en esa forma es eliminado vía biliar. Parte del metilmercurio eliminado por esta vía es excretado a través de las heces y parte puede ser nuevamente reabsorbido. En este punto entra en juego la microbiota intestinal, la cual puede demetilar el metilmercurio a mercurio inorgánico (Rowland *et al.*, 1980), facilitando de esta forma su eliminación fecal.

9. ESTUDIOS DE BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD

La evaluación del riesgo asociado a la ingesta de un compuesto presente en los alimentos se lleva a cabo en la mayoría de los casos determinando su contenido en el producto que se comercializa y calculando la ingesta a través de los datos de consumo existentes. Sin embargo, el alimento ingerido está sujeto a una serie de procesos que condicionan la llegada del compuesto de interés a la circulación sistémica y que pueden afectar de forma muy importante a su efecto. Por ello, digestión, absorción y metabolismo deben ser considerados en la evaluación del riesgo/beneficio asociado a la ingesta de un producto alimentario. En los siguientes apartados se da una visión general sobre los acontecimientos que tienen lugar durante la digestión y absorción de un compuesto, la forma de evaluar estos procesos, los factores que pueden modularlos y se reportan los escasos estudios existentes sobre mercurio en lo que a esta temática se refiere.

9.1. Definición de bioaccesibilidad y biodisponibilidad

El proceso digestivo consiste en una serie de etapas enzimáticas que producen la hidrólisis de los componentes mayoritarios del alimento (grasas, hidratos de carbono y proteínas) con la consiguiente liberación de numerosos nutrientes, pero también de los posibles contaminantes presentes en la matriz. La bioaccesibilidad se define como la extracción y puesta en disolución de un determinado compuesto

de la matriz alimentaria durante el proceso de digestión gastrointestinal (Ng *et al.*, 2009). La fracción solubilizada, denominada fracción bioaccesible (figura 3), está disponible para su absorción a través de la pared gástrica e intestinal, y su posterior paso a la circulación sistémica, donde ejerce su efecto beneficioso o perjudicial. Este proceso de solubilización depende de numerosos factores. Además de los factores intrínsecos, que pueden variar dependiendo del individuo (pH, concentración de las enzimas digestivas, tiempo de residencia), también hay factores externos, procedentes de la dieta, que pueden modificar la cantidad de fracción soluble tras la digestión (Oomen *et al.*, 2002; Dean y Ma, 2007; Yu *et al.*, 2010; He y Wang, 2011). La influencia de estos factores depende del compuesto considerado y de la forma química en la que se encuentre.

El término biodisponibilidad recibe numerosas definiciones dependiendo del campo de aplicación (NRC, 2003). En nutrición y toxicología alimentaria puede definirse como la cantidad de un nutriente o contaminante alimentario que tras su solubilización durante la digestión gastrointestinal es absorbida a través del epitelio gastrointestinal y llega a la circulación sistémica (Ng *et al.*, 2009). En ocasiones los términos biodisponibilidad y absorción intestinal se emplean indistintamente. Sin embargo, hacen referencia a conceptos diferentes; la absorción intestinal es sólo un paso dentro de los procesos que permiten que un determinado compuesto esté biodisponible (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004). La fracción que llega al torrente sanguíneo (fracción biodisponible, figura 3) puede diferir en gran medida de la fracción bioaccesible, ya que el proceso de absorción es muy complejo y depende de múltiples factores, que están principalmente gobernados por la naturaleza del compuesto y la composición del quimo, tal y como se comentará más adelante (apartado 9.3). Además, tras la absorción, el compuesto puede experimentar un metabolismo hepático (figura 3) y por tanto afectar a la fracción del compuesto que llega a la circulación sistémica.

La evaluación de estos procesos se puede realizar *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Las evaluaciones *in vivo* (sección 9.4) son las más deseables ya que consideran todas las etapas que intervienen en la llegada de un compuesto a la circulación sistémica y además el animal no ha sido sometido a ningún proceso quirúrgico. Los estudios de biodisponibilidad *in vivo* se llevan a cabo principalmente en roedores, cerdos, primates y cuando se trata de compuestos sin carácter tóxico, también se pueden realizar en humanos. Los modelos *in situ* empleando técnicas de perfusión en los que el animal está anestesiado, permiten un mejor control de determinados parámetros y en muchas ocasiones una mejor interpretación de los resultados que los métodos *in vivo*. El animal, sufre sin embargo un proceso quirúrgico que puede alterar algunos de los parámetros a estudiar. Esta aproximación es especialmente válida para evaluar mecanismos de transporte y factores que influyen en los mismos. Las aproximaciones *in vitro* permiten llevar a cabo un gran número de ensayos, en un corto periodo de tiempo y no tienen ningún tipo de connotación ética. La combinación *in vitro* de una digestión gastrointestinal simulada (sección 9.2) y de un modelo celular o tisular de epitelio intestinal para emular la absorción (sección 9.3) se ha evidenciado útil para predecir la biodisponibilidad *in vivo* de numerosos nutrientes. Mediante esta aproximación inicialmente se valora el contenido de mercurio bioaccesible y posteriormente el transporte del mercurio presente en la fracción bioaccesible a través de la monocapa formada por las células intestinales. En muchos casos, debido a la dificultad de llevar a cabo una aproximación adecuada de la etapa de absorción intestinal, se considera sólo el parámetro de bioaccesibilidad, entendiendo que éste da información sobre la cantidad máxima de un compuesto que puede llegar finalmente a la circulación sistémica, es decir de la máxima biodisponibilidad oral.

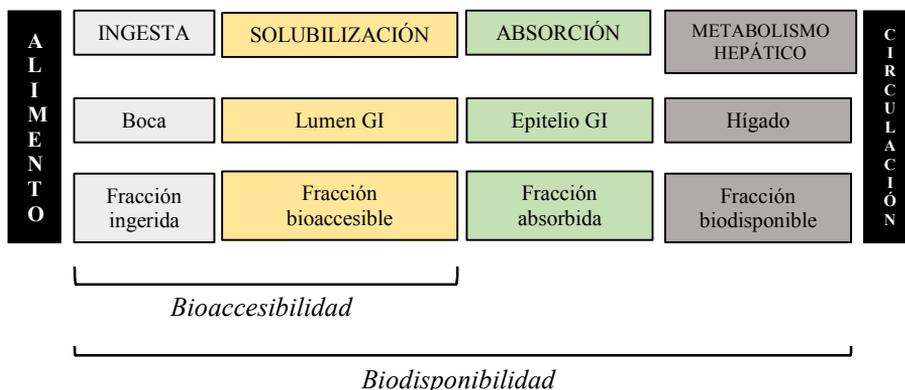


Figura 3. Conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

9.2. Modelos para la evaluación de la bioaccesibilidad. Aplicación a alimentos con especies mercuriales

Los sistemas *in vitro* para estudiar la bioaccesibilidad se pueden clasificar en dos grandes categorías: dinámicos y estáticos. Los sistemas dinámicos, consisten en una serie de compartimentos donde se emulan las condiciones de cada una de las partes del sistema digestivo. Los dos sistemas dinámicos más empleados son el SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem, figura 4a) y el TIM (TNO intestinal model; figura 4b). Estos sistemas contemplan hasta cierto punto, los cambios fisiológicos que tiene lugar durante el proceso de digestión, mediante cambios de pH y concentraciones enzimáticas y salinas, incluso con la simulación de los movimientos peristálticos, todo ello controlado mediante softwares informáticos. El SHIME y el TIM-2 además incluyen una etapa intestinal colónica donde se incorpora la microbiota intestinal (Molly *et al.*, 1994; Venema *et al.*, 2000). Estos sistemas dinámicos emulan mejor las condiciones fisiológicas que los estáticos, sin embargo, tiene una serie de desventajas, especialmente para el estudio de micronutrientes o elementos traza. Los volúmenes de trabajo son grandes, lo que

supone un problema para la posterior detección del compuesto. Por otro lado, sólo están disponibles en determinados laboratorios y no es fácil su montaje y mantenimiento, además del elevado coste de la instrumentación. Finalmente, debido a su complejidad, el número de muestras que se pueden evaluar en un corto espacio de tiempo es muy reducido.

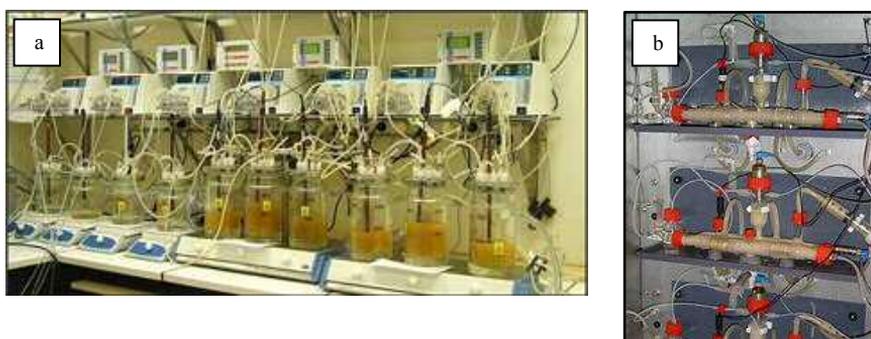


Figura 4. Sistemas dinámicos de digestión *in vitro*, a) SHIME (<http://www.prodigest.eu>); b) TIM (<http://www.tno.nl>).

Los modelos *in vitro* estáticos son los más empleados debido a su sencillez, disponibilidad y fácil manejo. En estos modelos, las etapas bucal, gástrica e intestinal se llevan a cabo en condiciones fijas de pH, tiempos y concentraciones de sales, enzimas y ácidos biliares. Los movimientos peristálticos se emulan por simple agitación. Aunque es una aproximación simplista, estos sistemas muestran para determinados compuestos una buena correlación con los resultados obtenidos *in vivo* (Bruce *et al.*, 2007).

Hay que destacar que la mayoría de nociones que se tiene sobre estas metodologías de bioaccesibilidad, en lo que a contaminantes se refiere, proceden

del desarrollo y aplicación de las mismas en el análisis de suelos contaminados, donde incluso se han propuesto y aprobado métodos oficiales que forman parte de la evaluación de riesgos (U.S. EPA, 2007a,b,c). Su aplicación a alimentos y especialmente a contaminantes metálicos es muy reciente y está muy poco extendida. En lo que al mercurio en alimentos se refiere, los estudios se han centrado principalmente en productos pesqueros y más concretamente en muestras procedentes de grandes depredadores marinos, empleando en la mayoría de los casos modelos estáticos de digestión. Estos estudios muestran que la cantidad de mercurio que se libera de los productos pesqueros durante la digestión gastrointestinal es muy variable. Torres-Escribano *et al.* (2010) muestran una bioaccesibilidad en pez espada que varía entre 38 y 83%. Esta bioaccesibilidad es algo inferior a la descrita para mariscos (72-102%) por Calatayud *et al.* (2012). Los porcentajes de bioaccesibilidad disminuyen en gran medida, hasta un 60%, cuando se trata de pescado cocinado (Ouédraogo y Amyot, 2001; Torres-Escribano *et al.*, 2011). Torres-Escribano *et al.* (2011) atribuyen este hecho a una alteración de la conformación estructural de las proteínas musculares de los productos pesqueros producida por la temperatura, lo que podría impedir el acceso de las enzimas digestivas a las estructuras a las que se une el mercurio en la matriz alimentaria. Asimismo, la bioaccesibilidad del mercurio en productos pesqueros se reduce en presencia de otros alimentos, tal y como se comentará en el apartado 9.4, posiblemente por la formación de complejos de solubilidad reducida tras la digestión gastrointestinal.

Se ha reportado datos de bioaccesibilidad de mercurio empleando el modelo dinámico SHIME, con ciertas modificaciones para ajustar volúmenes y permitir la detección del metal en las fracciones bioaccesibles (Laird *et al.*, 2009). El dato más relevante de este estudio es el referente a la incorporación de la microbiota intestinal en la etapa final del proceso digestivo. En presencia de microorganismos, la cantidad de mercurio en forma de metilmercurio en la fracción digerida decrece hasta un

100% con respecto a la digestión del mismo producto llevada a cabo en condiciones estériles. La explicación más plausible a este fenómeno es que la microbiota incorporada transforma el metilmercurio en mercurio inorgánico.

9.3. Modelos *in vitro* para estudios de la absorción intestinal. Aplicación a la evaluación de alimentos con especies mercuriales

Existen numerosas aproximaciones *in vitro* para evaluar la permeabilidad o transporte de un compuesto (figura 5). Entre ellas, las líneas celulares derivadas de cánceres colorrectales han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de la absorción de fármacos y nutrientes. Algunos de estos tipos celulares tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio diferenciado y manteniendo la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*.

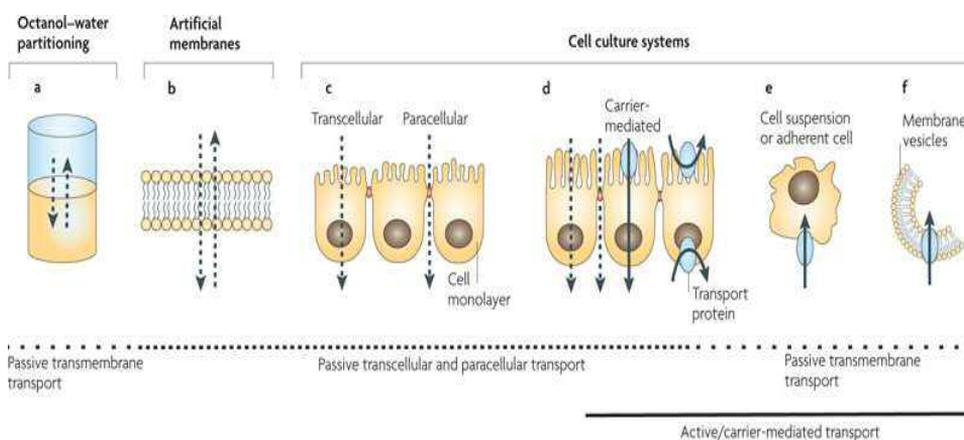


Figure 5. Técnicas *in vitro* para evaluar el transporte de un determinado compuesto (Sugano *et al.*, 2010).

La línea celular humana Caco-2, aislada originariamente de un adenocarcinoma de colon es, en la actualidad, la más utilizada en los estudios de absorción y en la evaluación de los factores que pueden afectar a este proceso. En 1990, esta línea celular se introdujo como una herramienta experimental para estudios sobre los mecanismos de transporte intestinal y un año más tarde se sugirió que el modelo era adecuado para el monitoreo de la permeabilidad intestinal de fármacos y para la predicción de la absorción oral de los mismos (Tavelin, 2003). Numerosos estudios han demostrado que el empleo de esta línea crecida sobre sistemas bicamerales (figura 6) permite predecir la absorción en humanos a través del cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}), parámetro que evalúa la velocidad de paso a través de la monocapa celular (Artursson y Karlsson, 1991; Yee, 1997; Yamashita *et al.*, 2000; Artursson *et al.*, 2001).

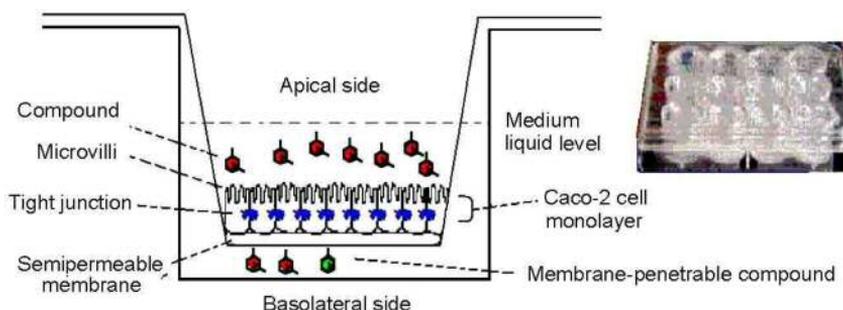


Figure 6. Sistema bicameral para estudios de absorción intestinal empleando células Caco-2 (Yang *et al.*, 2007).

Esta línea celular, se diferencia en cultivo dando lugar a una monocapa celular bien polarizada con las características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros (Hidalgo *et al.*, 1989). Evaluaciones realizadas por distintos laboratorios ponen de manifiesto que presentan una expresión de transportadores similar desde

el punto de vista cualitativo a la del intestino delgado (Maubon *et al.*, 2007). Sin embargo, las monocapas epiteliales formadas por las células Caco-2 presentan características que, dependiendo de la naturaleza del compuesto, pueden ser un inconveniente a la hora de estudiar su permeabilidad. Uno de sus principales inconvenientes es el tamaño del espacio entre células. Debido a su origen colónico, las uniones intercelulares son muy estrechas en relación con las presentes en el intestino delgado, lo que supone una desventaja para los compuestos que se mueven a través de estas uniones (vía paracelular). Los estudios previos, tal y como se indica en el apartado 8.1, muestran que las formas mercuriales no emplean o al menos no es mayoritaria la vía paracelular en su transporte, por tanto, la valoración de su tasa de transporte no debe verse afectada cuando se trabaja con monocapas celulares donde el espacio intercelular es reducido, tal y como ocurre con las monocapas formadas por la línea celular Caco-2.

Una forma de resolver parcialmente esta situación es mediante la inclusión en los cultivos de otra línea celular humana, HT29-MTX. La línea celular HT-29 fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh y Trempe, 1975). La línea HT29- MTX es un clon de la línea parental HT-29, la cual presenta un fenotipo secretor de mucus, obtenido por tratamientos sucesivos con 10^{-7} - 10^{-6} M de metotrexato (Lesuffleur *et al.*, 1990). Estas células activan espontáneamente durante el crecimiento a post-confluencia, un programa de diferenciación caracterizado por el establecimiento de contactos de adhesión, la formación de una monocapa de células mucosecretoras polarizadas con un núcleo basal, numerosas vacuolas de mucus acumuladas en el citoplasma de la región apical de las células y algunas microvellosidades apicales que no llegan a formar un borde en cepillo maduro. La combinación de estas células con la línea celular Caco-2 aumenta el espacio entre las uniones intercelulares y produce una monocapa epitelial con una capa de mucus superficial (Hilgendorf *et al.*, 2000; Artursson *et al.*, 2001).

Otro inconveniente de la línea celular Caco-2 es la expresión del transportador de la familia ABC, P-glicoproteína (P-gp, MDR1), el cual presenta una mayor expresión que en el intestino delgado humano (Tavelin, 2003). Esta proteína se localiza en el dominio apical de Caco-2 y media la eliminación de compuestos del interior celular al lado apical (Hunter *et al.*, 1993), evitando de esta forma que puedan atravesar el dominio basal y entrar a circulación sistémica. Una sobreexpresión de este transportador puede, por lo tanto, suponer una subestimación de la tasa de absorción de los sustratos de esta proteína (Tavelin, 2003). Los estudios sobre los mecanismos de transporte de las formas mercuriales no evidencian que esta proteína esté implicada en sus procesos de eliminación celular o tisular. Por tanto, en principio, los principales inconvenientes de esta línea celular no parecen suponer un problema para el estudio de la biodisponibilidad de las formas de mercurio.

Los estudios sobre el transporte intestinal de las formas mercuriales empleando la línea celular Caco-2 son escasos y en su mayoría evalúan los mecanismos responsables de transporte (sección 8.1). Vázquez *et al.* (2015a,b) muestran que el transporte y la acumulación en las monocapas diferenciadas generadas por esta línea celular son mayores para el metilmercurio que para el mercurio inorgánico, tal y como indican los estudios *in vivo* (sección 8.1). Calatayud *et al.* (2012), emplean esta línea celular para determinar la cantidad de mercurio que puede ser absorbido desde productos pesqueros. En este estudio, los autores combinan una digestión gastrointestinal con cultivos celulares y evidencian que el transporte es menor cuando el mercurio forma parte de un alimento que cuando está en solución acuosa; además ponen de manifiesto una importante retención celular del metal. Esta retención también se observa trabajando con co-cultivos de células Caco-2 y células HT29-MTX (Vázquez *et al.*, 2013). En este caso, se observa que parte de la retención se debe a la acumulación de Hg(II) y metilmercurio en la capa de mucus generada por HT29-MTX. Asimismo, algunos estudios que emplean la

aproximación *in vitro* para estudiar la biodisponibilidad sugieren que el transporte del mercurio está influenciado por la presencia de determinados compuestos, algunos de los cuales tienen un origen alimentario (sección 9.5).

9.4. Modelos *in vivo* para estudios de la biodisponibilidad. Aplicación a la evaluación de mercurio

La dosificación de un compuesto y la posterior determinación del mismo en el plasma o en fluidos biológicos o excretas a distintos intervalos de tiempo permiten el cálculo de la biodisponibilidad absoluta o relativa. La biodisponibilidad absoluta es el porcentaje real de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica. La estimación implica comparar la exposición después de una administración extravascular con la de una administración intravenosa, que se considera el 100% de biodisponibilidad. La biodisponibilidad relativa implica la comparación de dos formas de administración distintas de un mismo compuesto sin referencia a una administración intravenosa.

Existen muchos métodos para evaluar el grado de biodisponibilidad, el más clásico consistente en comparar la exposición plasmática a través del parámetro del área debajo de la curva (AUC). Para la biodisponibilidad oral absoluta se compara AUC después de una administración extravascular con el valor AUC de una administración intravenosa. El factor de biodisponibilidad (F) se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$F\% = \frac{\text{AUC e. v.}}{\text{AUC i. v.}} \times \frac{\text{Dosis i. v.}}{\text{Dosis e. v.}} \times 100$$

donde,

AUC es el área bajo la curva que se obtiene al representar la concentración plasmática (total o libre) del compuesto o la concentración total de la sangre

versus el tiempo tras una dosificación extravascular (e.v.) o intravenosa (i.v.).

Dosis indica las concentraciones del compuesto administradas por ambas vías.

Con la aplicación de esta ecuación se asume que el aclaramiento corporal (volumen del plasma que queda libre del compuesto por minuto) es el mismo para ambas formas de administración.

La biodisponibilidad absoluta también puede evaluarse midiendo la cantidad de compuesto excretado en orina o cualquier otro fluido biológico o excreta, usando la siguiente ecuación:

$$F\% = \frac{E \text{ e. v.}}{E \text{ i. v.}} \times \frac{\text{Dosis i. v.}}{\text{Dosis e. v.}} \times 100$$

donde E es la cantidad del compuesto eliminado por orina u otra vía.

La aplicación de esta ecuación asume que los ratios de aclaramiento renal y aclaramiento total son iguales para ambas vías de administración. El principal límite de esta aproximación es que hay que recoger orina o cualquier otro fluido o excreta hasta que el compuesto haya sido prácticamente eliminado (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004).

La biodisponibilidad relativa puede medirse por comparación de AUC o la eliminación por algún fluido o excreta de un compuesto dosificado de dos formas diferentes, pero en la misma cantidad. En este caso la biodisponibilidad se calcula mediante las siguientes ecuaciones:

$$F\% = \frac{AUC_a}{AUC_{\text{referencia}}} \times 100$$

$$F\% = \frac{E_a}{E_{\text{referencia}}} \times 100$$

donde,

Subíndice *a* hace referencia a la nueva matriz, formulación o condición a evaluar

Subíndice *referencia* indica la matriz, formulación o condición con la cual se compara la nueva dosificación.

Se han propuesto muchos métodos para el cálculo de AUC. En cualquiera de los casos, el diseño experimental debe ser el adecuado para evitar una subestimación del AUC (tiempos de muestreo insuficientes en la fase ascendente de la cinética) o una sobreestimación del AUC (tiempos de muestreo insuficientes en la parte descendente de la curva) (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004). El área bajo la curva (figura 7), sea desde cero hasta el último tiempo experimental de muestreo (AUC_{0T}) o hasta el tiempo infinito ($AUC_{0\infty}$), se obtiene de la suma de los trapecios generados con los datos tiempo/concentración (t/C), desde cero hasta el tiempo T, agregando en el caso $AUC_{0\infty}$ la extrapolación hasta infinito (Fagiolino *et al.*, 2010).

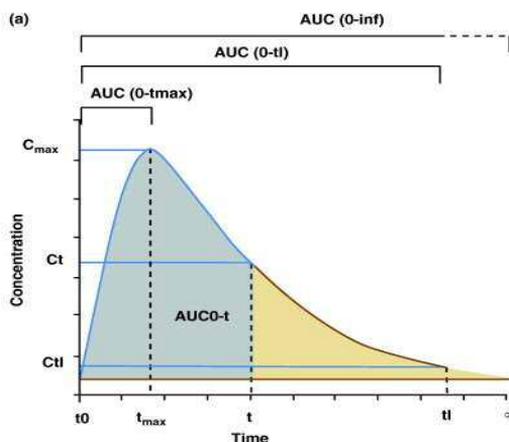


Figura 7. Representación del área debajo la curva y diferentes parámetros farmacocinéticos (Jambou *et al.*, 2011).

Los estudios sobre biodisponibilidad oral de las formas mercuriales en animales de laboratorio indican, tal y como se ha indicado en el apartado 8.1, que el metilmercurio está más biodisponible que el mercurio inorgánico, tanto cuando se dosifica con el agua como cuando se vehicula a través de los alimentos. También se ha puesto de manifiesto que esta biodisponibilidad está influenciada por numerosos factores (edad, pH del lumen, compuestos de origen alimentarios o alimentos). Los estudios sobre la modulación de la biodisponibilidad del Hg(II) y metilmercurio en presencia de componentes de la dieta son escasos (ver sección 9.5) y todos ellos evalúan la influencia mediante una dosificación del mercurio en solución acuosa; en ningún caso se emplean alimentos.

9.5. Factores dietarios que afectan la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del mercurio

Existen algunos estudios que evalúan el efecto de determinados alimentos sobre la bioaccesibilidad *in vitro* del mercurio. Los extractos de té verde y té negro producen disminuciones muy importantes de la cantidad de mercurio en la fracción bioaccesible de alimentos, que oscilan entre un 35% y 91%, incluso cuando éstos se ensayan en pequeñas cantidades (Shim *et al.*, 2009; He y Wang, 2011; Ouedraogo y Amyot, 2011). El café instantáneo también muestra una reducción de la bioaccesibilidad del mercurio; entre un 10% y un 50% en pescados como la caballa, atún y tiburón (Ouedraogo y Amyot, 2011). La proteína de soja reduce la bioaccesibilidad de mercurio (44-87%) desde productos pesqueros, de manera dosis-dependiente (Shim *et al.*, 2009). También se ha observado una disminución de la bioaccesibilidad en presencia de zumo de pomelo (Shim *et al.*, 2009; He y Wang, 2011). Estas investigaciones indican que determinados componentes alimentarios pueden afectar la solubilización del mercurio presente en los alimentos

durante la digestión y por tanto pueden afectar su posterior absorción y biodisponibilidad.

Existen numerosos estudios *in vivo* que evidencian que algunos componentes de la dieta pueden reducir la toxicidad de las formas mercuriales administradas oralmente (sección 7.5); sin embargo, son escasos los que analizan si este efecto beneficioso puede deberse a una modificación de la absorción intestinal del mercurio (Chapman y Chan, 2000). El selenio se considera antagonista del efecto tóxico del mercurio. Parte de esta protección puede ser debida a un efecto directo sobre la absorción, disposición y eliminación del mercurio. De hecho, Orct *et al.* (2009), en un estudio realizado en ratas lactantes expuestas simultáneamente a selenio y Hg(II) durante 4 días, muestran que la concentración de mercurio en órganos y plasma disminuye con las dosis orales más altas de selenio. Magos y Webb (1977) observan el efecto contrario en ratones co-expuestos a metilmercurio y Se(IV) vía intragástrica. Tras 48 horas, los animales tratados con Se(IV) tiene significativamente más mercurio en el cerebro que las ratas tratadas únicamente con metilmercurio.

Las grasas comestibles también afectan la toxicocinética del Hg(II) y el metilmercurio, aunque los datos de los estudios son contradictorios. Højbjerg *et al.* (1992), trabajando con grasas (aceite de hígado de bacalao, aceite de coco y aceite de soja) demuestran que el tipo y cantidad de grasa en la dieta afecta la retención y la distribución del metilmercurio y el Hg(II) administrado oralmente a ratones. Sin embargo, Jin *et al.* (2007) en un estudio llevado a cabo en ratas muestran que las grasas (aceite de soja, aceite de foca, el ácido docohexaenoico o el aceite de pescado) no son factores determinantes en la distribución del mercurio en cerebro y sangre.

Se ha puesto de manifiesto una reducción del efecto del metilmercurio y un aumento de su eliminación en animales tratados con distintos tipos de fibra

(Rowland *et al.*, 1986; Shim *et al.*, 2009). Se sabe que el metilmercurio experimenta una recirculación enterohepática extensa y se ha demostrado que la fibra se une *in vitro* al mercurio e interrumpe esta recirculación enterohepática, lo que conduce a una mayor ratio de eliminación. Por otro lado, la fibra puede afectar el metabolismo del metilmercurio. La incorporación de un 30% de salvado en la dieta de ratones disminuye la concentración total de mercurio en el cerebro, la sangre y el intestino delgado (Rowland *et al.*, 1986). Estos autores muestran que hay una mayor proporción de mercurio en forma de Hg(II) en el hígado, riñones, cerebro e intestino de los animales tratados con salvado, lo que les lleva a concluir que el salvado ejerce su efecto sobre la retención de mercurio a través de una modificación de la actividad metabólica de la microbiota intestinal. La leche tiene un efecto contrario al salvado, Landry *et al.* (1979) muestran que una dieta basada en leche en ratones mejora la reabsorción de metilmercurio. Los autores sugieren que esto se debe a una disminución de la demetilación de metilmercurio por la microbiota intestinal.

Otro componente dietario que se ha propuesto como posible protector de la toxicidad del mercurio son los probióticos (Brudnak, 2002). De hecho, se ha puesto de manifiesto que algunas bacterias lácticas pueden unir mercurio en forma inorgánica divalente (Kinoshita *et al.*, 2013). Los datos de este ensayo *in vitro* muestran que todas las cepas de bacterias lácticas seleccionadas (50 *Lactobacillus*, 19 cepas derivadas de yogur, 8 *Weissella*, 4 cepas de *Pediococcus*, 2 de *Streptococcus* y 2 *Enterococcus*) disminuyen hasta un 85% la concentración de Hg(II) en solución salina. En un estudio reciente, Majlesi *et al.* (2017) muestran que este poder de quelación de las bacterias lácticas podría ser una estrategia adecuada para evitar la llegada de mercurio a sangre tras una ingesta oral. Estos autores co-administran ratones con Hg(II) y *Lactobacillus plantarum* o *Bacillus coagulans* y observan un aumento de la excreción fecal de mercurio.

Finalmente hay que reseñar la primera intervención llevada a cabo para reducir la absorción de mercurio en poblaciones empleando probióticos (Bisanz *et al.*,

2014). En este estudio se administra durante 24 días a mujeres embarazadas y niños un yogurt conteniendo *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 (1×10^{10} unidades formadoras de colonias por 250 g). La dosificación del probiótico no tiene efecto en los niveles plasmáticos de mercurio en la población infantil. Sin embargo, los autores muestran una reducción estadísticamente significativa de los niveles de mercurio en la sangre de mujeres embarazadas tratadas con el probiótico, si bien no es relevante desde el punto de vista toxicológico.

Objetivos

Reducir la exposición a mercurio de la población, especialmente de aquellos grupos que viven en zonas contaminadas o aquellas poblaciones en las que los productos pesqueros son una base importante en sus dietas, es una prioridad para las autoridades sanitarias. También lo es para grupos poblacionales identificados como susceptibles (niños y mujeres embarazadas o en periodo de lactancia) que requieren del consumo de estos productos debido a su valor nutricional. No es una tarea fácil evitar la contaminación del alimento o eliminar el contaminante previamente su consumo, siendo necesario buscar vías alternativas para disminuir la exposición a mercurio sin eliminar de la dieta estos productos alimentarios. Entre las posibles vías de actuación está la de reducir selectivamente la llegada del tóxico a la circulación sanguínea tras su ingesta oral, sin comprometer la llegada de otros elementos esenciales. Para ello se puede actuar a distintos niveles; se puede disminuir la cantidad de tóxico que tras la digestión está disponible para la absorción, reducir la tasa de transporte por procesos de competencia o influir sobre los procesos de recirculación enterohepática. El empleo de compuestos de origen alimentario que formen parte de nuestra dieta habitual, es la aproximación más segura para conseguir este propósito.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo general de la presente tesis doctoral es la REDUCCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL MERCURIO COMO ESTRATEGIA PARA DISMINUIR LA EXPOSICIÓN ORAL AL TÓXICO.

Para llevar a cabo este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

A) Caracterización del Hg presente en los alimentos y en las fracciones solubles que se obtienen tras el proceso de digestión, con el fin de evaluar la potencial toxicidad del Hg que puede llegar a la circulación sanguínea tras la ingesta (ensayos *in vitro*).

B) Identificación de las condiciones de digestión que favorecen la liberación del Hg de las matrices alimentarias y determinar el ratio molar Se/Hg en estas condiciones, un parámetro empleado en la evaluación del riesgo asociado a la ingesta de alimentos con Hg (ensayos *in vitro*).

C) Identificación de compuestos alimentarios o microorganismos empleados en la industria alimentaria que puedan reducir la cantidad de mercurio soluble tras el proceso de digestión gastrointestinal (ensayos de bioaccesibilidad *in vitro*).

D) Identificación de aquellos compuestos alimentarios o microorganismos de grado alimentario que pueden ejercer un efecto directo sobre el proceso de absorción intestinal de las formas mercuriales Hg (ensayos de transporte celular *in vitro*).

E) Evaluación *in vivo* de la capacidad de los componentes de la dieta seleccionados en los apartados anteriores para reducir la biodisponibilidad de las formas mercuriales.

Metodología

1. ESPECIES MERCURIALES

Las disoluciones de Hg inorgánico [Hg(II)] y metilmercurio (CH₃Hg) empleadas a lo largo de la tesis fueron preparadas por dilución de los patrones comerciales de Hg(NO₃)₂ (1000 mg/L, Merck) y CH₃HgCl (1000 mg/L, AlfaAesar) respectivamente. Las concentraciones se han expresado como mg/L de Hg para facilitar la comparación entre tratamientos.

2. MUESTRAS DE ALIMENTOS

Se han empleado tres matrices alimentarias adquiridas en comercios españoles: pez espada (*Xiphia gladius*), atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y setas deshidratadas. Las muestras de pez espada y atún correspondían a rodajas de producto descongelado con un peso medio aproximado de 120-150 g. Las setas pertenecían a varias especies: *Amanita cesarea*, *Amanita ponderosa*, *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Lepiota procera*, *Marasmius oreades* y *Tricholoma georgii*. Al menos que se indique lo contrario, los alimentos ensayados fueron cocinados en la sartén sin empleo de ingredientes adicionales. Posteriormente se trituraron, homogenizaron y almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis.

3. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

Se empleó un método estático que simula las etapas gástrica e intestinal del proceso de digestión humana (figura 8; Laparra *et al.*, 2003). En la aplicación del método se utilizaron los siguientes equipos: pH-metro (Consort modelo C830), agitador orbital (Stuart modelo SSL1), centrífuga (RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall, Du Pont).

Etapa gástrica. Se pesó en un erlenmeyer una cantidad de alimento (10 g para pescados y 1 g para setas) o un volumen de patrón acuoso de Hg(II) y CH₃Hg

(concentración final 1 mg/L). Se adicionaron 90 g de agua desionizada y la mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl (Merck) y se completó el peso hasta 100 g con agua desionizada. Para llevar a cabo la etapa gástrica se utilizó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0,1 mol/L. Se adicionó el volumen necesario para proporcionar 2 mg de pepsina/g de muestra, equivalente en las condiciones del método a 20 mg pepsina/100 g de disolución. Posteriormente el erlenmeyer se tapó con parafilm y se incubó en agitación (120 rpm) a 37 °C durante 2 h.

Etapa intestinal. Se ajustó el pH del digerido gástrico a 6,5 utilizando NH₃ (Scharlau, Scharlab) y se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad equivalente a 4 × especificaciones de Farmacopea de EEUU/mg de pancreatina) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares).

Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0,4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2,5% (m/v) en NH₄CO₃ 0,1 mol/L (Merck). Se adicionó al digerido el volumen necesario para proporcionar 0,5 mg de pancreatina/g de muestra y 3 mg de extracto biliar/g de muestra. Estas cantidades equivalen en las condiciones del método a 5 mg de pancreatina/100 g de disolución y 30 mg de extracto biliar/100 g de disolución. La mezcla se tapó con parafilm y se incubó nuevamente en agitación (120 rpm) durante 2 h a 37 °C. Una vez finalizada la etapa intestinal, se ajustó el pH a 7,2 con NH₃. El digerido obtenido se centrifugó (10000 rpm/30 min/4 °C) para separar la fracción soluble (bioaccesible) y el residuo.

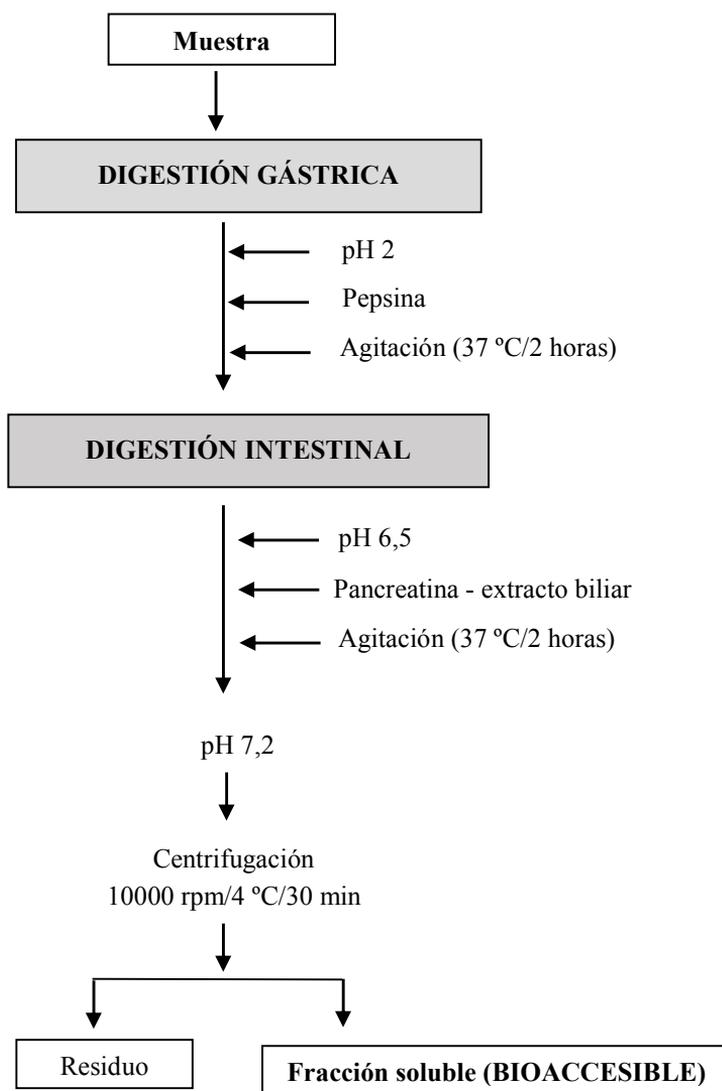


Figura 8. Esquema del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Modelo empleado para la determinación de la bioaccesibilidad de Hg en patrones acuosos y alimentos.

En la fracción soluble se cuantificó el contenido en Hg utilizando la metodología que se describe en el apartado 4. Para la evaluación de la bioaccesibilidad de Hg se utilizó la ecuación 1.

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{\text{Contenido de Hg en la fracción bioaccesible}}{\text{Contenido de Hg en el alimento o patrón acuoso}} \times 100$$

(Ecuación 1)

4. DETERMINACIÓN DE MERCURIO

Las muestras se sometieron a un proceso de digestión ácida en horno de microondas. Para ello, se colocaron en reactores de teflón y se adicionó 4 mL de HNO₃ 14 mol/L (Merck) y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v, Panreac). Todas las muestras de la presente tesis (alimentos, fracciones bioaccesibles, células intestinales, bacterias, levaduras, medios de incubación y cultivo, tejidos animales y heces) fueron digeridas empleando este método. La cantidad digerida de cada muestra varió en función de la naturaleza de la matriz y de la concentración de Hg esperada. Los reactores se irradiaron en un horno de microondas (MARS) de CEM (Vertex) a 800 W de potencia durante 15 min (180 °C). Tras la digestión, los digeridos se colocaron en tubos de 15 mL y se dejaron reposar durante toda la noche con el fin de eliminar los vapores nitrosos que pudieran interferir en la lectura. Posteriormente se llevaron a volumen final de entre 8 y 15 mL con HCl 0,6 mol/L.

La cuantificación de Hg se llevó a cabo mediante espectrometría de fluorescencia atómica acoplada a vapor frío (CV-AFS) (PSA 10.025 Millenium Merlin, PS Analytical). Las condiciones instrumentales utilizadas para la cuantificación se detallan en la tabla 3.

Disolución reductora	SnCl ₂ 2% (m/v) en HCl al 15% (v/v). Flujo 4,5 mL/min
Blanco de reactivos	HCl al 5% (v/v). Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 0,1 L/min
Gas de secado	Argón. Flujo 0,3 L/min
Tiempo de demora	15 s
Tiempo de medida	40 s
Tiempo de retorno	60 s
Rango de amplificación	100
Filtro	32

Tabla 3. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Hg mediante CV-AFS.

Se utilizó una curva de calibrado de Hg(II) (0,025-2 ng/mL) preparada con HCl 0,6 mol/L. El control de calidad de la cuantificación se evaluó mediante el análisis de muestra de agua de referencia (RTC, QCI-049-1, LGC Standards) con un contenido certificado de Hg de $40,8 \pm 0,396 \mu\text{g/L}$.

5. DETERMINACIÓN DE SELENIO

Para el análisis de Se en pez espada y sus fracciones bioaccesibles se procedió a su mineralizaron por vía seca y posterior cuantificación empleando un espectrofotómetro de fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS) modelo Millennium Merlin (PSA Analytical).

La muestra se trató con 1 mL de agente de mineralización [20% m/v de MgNO₃ (Panreac) y 2% m/v de MgO (Merck)] y 5 mL de HNO₃ 7 mol/L. La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena (Raypa, modelo PL 5125, Sharlau) y posteriormente se mineralizó en un horno mufla (modelo K1253, Heraeus),

aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura (50 °C/hora), las muestras se mantuvieron 12 h a 450 °C. Si tras el ciclo de mufla se obtuvieron cenizas blancas se procedió a su disolución. En caso contrario, las cenizas se trataron con 5 mL de HNO₃ (50% v/v), se secaron nuevamente en el baño de arena y fueron sometidas al programa temperatura-tiempo en horno mufla indicado anteriormente. Las cenizas blancas obtenidas tras la mineralización se disolvieron en HCl 6 mol/L y posteriormente se calentaron a 90 °C durante 20 min.

La determinación de Se mediante HG-AFS se llevó a cabo empleando las condiciones instrumentales descritas en la tabla 4. La cuantificación se realizó frente a una curva de calibrado (1-10 ng/mL) preparada a partir de una disolución patrón de 1000 mg/L de Se(IV) (SeO₄, Merck).

Disolución reductora	NaBH ₄ 1,2% (m/v) en NaOH 0,4% (v/v). Flujo 4,5 mL/min
Blanco de reactivos	HCl 4,5 mol/L. Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 0,3 L/min
Gas de secado	Aire. Flujo 0,25 L/min
Tiempo de demora	15 s
Tiempo de medida	30 s
Tiempo de retorno	60 s
Rango de amplificación	100
Filtro	32

Tabla 4. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Se mediante HG-AFS.

Para el análisis del Se en setas y sus fracciones bioaccesibles se procedió a una digestión ácida asistida por microondas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4 y posterior cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS; modelo 7900, Agilent). Las condiciones instrumentales del ICP-MS se especifican en la tabla 5.

Flujo de gas auxiliar (Ar)	1,0 L/min
Flujo de gas de plasma (Ar)	15 L/min
Poder RF ICP	1550 W
Flujo de He	5,0 mL/min
Tiempo de estabilización	10 s
Energía de discriminación modo He	5,0 V
Tiempo de integración	0,1 s
Periodo de muestra	0,31 s
Modo de adquisición	Espectro
Nº réplicas	3
Lecturas por réplica	100
Isótopo monitorizado	^{78}Se
Patrón interno	^{72}Ge

Tabla 5. Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de Se mediante ICP-MS.

El control de calidad de la cuantificación de Se por ambas metodologías se evaluó mediante el análisis de una muestra de agua de referencia (RTC, QCI-049-1) con un contenido certificado de Se de $27,5 \pm 0,843 \mu\text{g/L}$.

6. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS MAYORITARIOS

Los contenidos de Ca, Mg, K, Fe y P de los alimentos y las fracciones bioaccesibles fueron analizados mediante espectrofotometría de emisión acoplada a plasma inductivo (ICP-OES; modelo 4300D, Perkin Elmer). Las muestras se digirieron empleando un horno microondas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4 y posteriormente se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua desionizada. Las condiciones instrumentales del análisis de los digeridos fueron las siguientes: potencia RF, 1300 W; flujo del gas de nebulización, 0,8 L/min; flujo del argón auxiliar: 0,2 L/min; flujo de argón: 15 L/min; flujo de la muestra: 2 mL/min; longitudes de onda (nm): Ca 317.933; Mg 285.213; K 766.490; Fe 238.204; P 213.617. Los patrones de Ca, Mg, K, Fe y P fueron adquiridos a Merck.

7. ESTIMACIÓN DEL RIESGO ASOCIADO A LA INGESTA DE ALIMENTOS CON MERCURIO

7.1. Forma química del mercurio en muestras de alimentos y sus fracciones bioaccesibles

Se analizaron las formas químicas del Hg en muestras de productos pesqueros y setas y en las fracciones bioaccesibles obtenidas tras la aplicación del modelo de digestión gastrointestinal simulada (apartado 3). El conocimiento de las formas de Hg permite una mejor evaluación del riesgo, ya que tal y como se ha comentado en la introducción, la biodisponibilidad y toxicidad de este metal están ligadas a la forma química. Por otro lado, conociendo las formas existentes en la fracción bioaccesible se pueden interpretar mejor los resultados obtenidos tras aplicar las distintas estrategias dietarias en los ensayos de bioaccesibilidad, absorción y biodisponibilidad. En base a estas formas químicas, también se puede intentar mejorar la eficacia de los tratamientos empleados.

La determinación de Hg(II) y CH₃Hg se realizó mediante separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y posterior detección por ICP-MS. Las muestras de alimentos (0,5 g) fueron extraídas empleando 10 mL de HCl 2,4 mol/L y 0,1 g de L-cisteína (Fluka). La mezcla se llevó a un baño de ultrasonidos durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min. Las muestras procedentes de la digestión gastrointestinal se analizaron sin tratamiento previo.

La separación cromatográfica se llevó a cabo con un cromatógrafo Flexar LC (Perkin Elmer) empleando una columna de fase reversa Kinetex C18 100 A (100 mm × 2,10 mm, 5,0 μm) (Phenomenex) conectada a una precolumna C8 (4 mm × 3,0 mm) (Phenomenex). La cromatografía se realizó mediante elución isocrática empleando como fase móvil una disolución 10% metanol y 0,4% β-mercaptoetanol (pH 2,5) a un flujo de 0,7 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 50 μL. En estas condiciones el CH₃Hg eluye a 2,26 min y el Hg(II) a 2,40 min (figura 9).

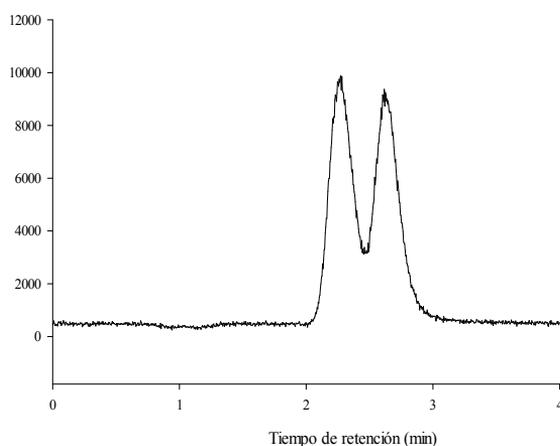


Figura 9. Cromatograma de una disolución patrón de CH₃Hg (25 μg/L) y Hg(II) (12,5 μg/L).

El HPLC se acopló a un espectrómetro de masas Nex-Ion 300X (Perkin Elmer). Las condiciones instrumentales del ICP-MS se especifican en la tabla 6.

Flujo de gas de nebulización (Ar)	0,89 L/min
Flujo de gas auxiliar (O ₂)	0,01 L/min
Flujo de gas auxiliar (Ar)	1,2 L/min
Flujo de gas de plasma (Ar)	0,89 L/min
Poder RF ICP	1600 W
Voltaje analógico	-1700 V
Voltaje de pulsos	900 V
Umbral discriminador	12 V
Voltaje del deflector	-7 V
Offset del cuádruplo	0
Voltaje de entrada de celda de colisión	-6 V
Voltaje de salida de celda de colisión	-6 V
Offset celda de colisión	-14 V
Isótopo monitorizado	Hg (m/z= 202)

Tabla 6. Parámetros instrumentales del ICP-MS para la especiación de Hg.

7.2. Factores del proceso digestivo que afectan la bioaccesibilidad de mercurio desde alimentos. Evaluación del ratio molar Se/Hg

Con objeto de evaluar la etapa de digestión determinante en la solubilización del Hg desde los alimentos y el efecto que factores propios del proceso digestivo como el pH, la concentración de pepsina y sales biliares o el tiempo de residencia podían ejercer sobre la solubilización de este elemento, se plantearon los estudios que se describen a continuación. Asimismo, se determinó el contenido de Se para evaluar el ratio molar Se/Hg en las muestras de alimentos y las fracciones bioaccesibles

obtenidas en las distintas condiciones de digestión gastrointestinal. Tal y como se ha comentado en la sección 7.5 de la introducción, este parámetro se considera de interés en la evaluación del riesgo asociado a la ingesta de un alimento con Hg.

El ratio molar Se/Hg se calculó teniendo en cuenta la ecuación 2.

$$\text{Ratio molar } \frac{\text{Se}}{\text{Hg}} = \frac{\text{Concentración Se en alimentos o bioaccesible}}{\text{Concentración Hg en alimentos o bioaccesible}} \times \frac{\text{Masa molar Hg}}{\text{Masa molar Se}}$$

(Ecuación 2)

El valor de la masa molar del Se y Hg es 78,98 g/mol y 200,59 g/mol respectivamente.

7.2.1. 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 pez espada cocinadas y 2 muestras de setas crudas. De cada muestra se destinó una porción (10 g para pescado y 1 g para setas) al proceso completo de digestión gastrointestinal, tal y como se describe en el apartado 3 y otra porción únicamente a la etapa gástrica. En este último caso, las muestras tras la digestión con pepsina durante 2 h, fueron centrifugadas (10000 rpm, 30 min a 4 °C). Tras la centrifugación, se determinó el Hg y Se en la fracción soluble.

7.2.2. Influencia de parámetros de la etapa gástrica en la solubilización de Hg y Se. La influencia de los parámetros de la digestión gástrica se evaluó en 6 muestras cocinadas de pez espada y 2 muestras de setas crudas. Los parámetros evaluados fueron los siguientes.

A) pH. Cada muestra se separó en varias porciones para ensayar distintos pHs (2, 3 y 4). A cada porción se le añadió 90 g de agua desionizada, ajustando la muestra al pH de interés con HCl. Tras llevar la muestra a 100 g con agua

desionizada, se aplicó la etapa de digestión gástrica, tal y como se describe en el apartado 3. El digerido obtenido se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 4 °C y posteriormente se analizaron los contenidos de Hg y Se en la fracción soluble (apartado 4 y 5 respectivamente).

B) Concentración de pepsina. Se evaluaron diferentes concentraciones de pepsina (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0,13 g pepsina/100 g de disolución a digerir). Cada una de las muestras se dividió en 6 porciones, que se sometieron a la etapa gástrica empleando las concentraciones de pepsina descritas. Posteriormente se analizaron los contenidos de Hg y Se en la fracción soluble.

C) Tiempo de digestión. Cada una de las muestras se dividió en 3 porciones, que se sometieron a la etapa gástrica empleando el protocolo descrito en el apartado 3, con la variación del tiempo de digestión (2, 4 y 6 h). Posteriormente se analizaron los contenidos de Hg y Se en la fracción soluble.

7.2.3. Influencia de parámetros de la etapa intestinal en la solubilización de Hg y Se. Los parámetros analizados fueron los siguientes:

A) Concentración de sales biliares. Se pesaron en erlenmeyers porciones independientes de una misma muestra, se añadieron a cada una de ellas 90 g de agua desionizada y se llevó a cabo la etapa gástrica tal y como se describe en el apartado 3. Posteriormente se aplicó la etapa intestinal en ausencia de sales biliares y en presencia de distintas concentraciones de sales (0,03; 1; 3 g de extracto biliar/100 g de disolución a digerir). Los digeridos obtenidos se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 min a 4 °C y posteriormente se analizó el contenido de Hg y Se en la fracción soluble. Los ensayos a cada concentración de sales biliares se llevaron a cabo en 6 muestras de pez espada cocinadas y 2 muestras de setas crudas.

B) Concentración de lipasa pancreática. Los ensayos se llevaron a cabo empleando 3 muestras de pez espada cocinadas que se sometieron a la etapa gastrointestinal completa descrita en el apartado 3. Los ensayos en porciones independientes de estas muestras se realizaron sin lipasa o con el uso en la etapa intestinal de concentraciones crecientes de lipasa pancreática de origen porcino (Sigma) (0,01; 0,05 y 0,1 g lipasa/100 g de disolución a digerir). Posteriormente se obtuvo la fracción bioaccesible por centrifugación y se analizaron los contenidos de Hg y Se.

C) Tiempo de digestión. Se emplearon 4 muestras cocinadas de pez espada y 2 muestras de setas crudas. Cada una de ellas se dividió en 3 porciones que se sometieron a la etapa gastrointestinal completa empleando el protocolo descrito en el apartado 3, con la variación del tiempo de digestión de la etapa intestinal (2, 4 y 6 h). Posteriormente se analizaron los contenidos de Hg y Se en la fracción soluble.

8. COMPONENTES DE LA DIETA QUE AFECTAN LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO

En este estudio se llevó a cabo una búsqueda de compuestos de origen alimentario o microorganismos de grado alimentario con capacidad para reducir la cantidad de Hg que tras la digestión quedaba soluble y por tanto disponible para la absorción intestinal (bioaccesibilidad). En todos los casos la evaluación se realizó en patrones acuosos de Hg(II) y CH₃Hg y muestras de alimentos (productos pesqueros y setas).

8.1. Influencia de los compuestos de origen alimentario en la bioaccesibilidad de mercurio

Se seleccionaron 28 compuestos alimentarios que se utilizaron a las concentraciones habituales en alimentos (tabla 7). El estudio constó de las siguientes etapas:

A) Evaluación del efecto de los compuestos sobre la solubilidad de las formas mercuriales [Hg(II) y CH₃Hg] en disolución acuosa. Las disoluciones patrón (1 mg/L) preparadas en tampón fosfato salino (PBS, Hyclone) se pusieron en contacto (30 min, agitación 120 rpm) con los compuestos a la concentración indicada en la tabla 7 y posteriormente se procedió al análisis del Hg en una alícuota del sobrenadante.

B) Evaluación del efecto de los componentes sobre la bioaccesibilidad del Hg presente en disolución acuosa. Tras el tiempo de contacto del patrón de Hg [1 mg/L de Hg(II) o CH₃Hg] con el componente alimentario (30 min), se aplicó una digestión gastrointestinal al conjunto (apartado 3).

C) Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad del Hg presente en alimentos. Los compuestos eficaces en la reducción de la bioaccesibilidad en disoluciones acuosas de Hg(II) y CH₃Hg (punto B) fueron posteriormente ensayados en alimentos. Las muestras de pez espada o atún y setas deshidratadas fueron adicionadas con las cantidades del componente indicadas en la tabla 7 y el conjunto se sometió a la digestión gastrointestinal simulada (apartado 3).

D) Evaluación de la capacidad de los compuestos alimentarios de reducir la bioaccesibilidad de cationes esenciales. Las fracciones bioaccesibles de alimentos obtenidas en el apartado C, en las que se observó una elevada reducción del Hg, fueron tratadas para determinar la concentración de Ca, Fe, Mg, K y P siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6. Una reducción de la fracción bioaccesible de

alguno de estos elementos indica que, aunque el componente reduce el riesgo asociado a la ingesta de Hg, produce un efecto negativo al reducir también la bioaccesibilidad de algún elemento esencial para el organismo y por tanto su uso no puede considerarse una estrategia adecuada.

Los contenidos de Ca, Fe, Mg, K y P en las fracciones bioaccesibles obtenidas en presencia de los compuestos alimentarios se compararon con los contenidos de las fracciones obtenidas en ausencia de los mismos.

E) Evaluación de la capacidad de los compuestos alimentarios de modificar las formas químicas de Hg. Las fracciones bioaccesibles de alimentos obtenidas en el apartado C en las que se observó una elevada reducción del Hg, fueron tratadas para determinar la concentración de Hg(II) y CH₃Hg siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.1. Debido al distinto grado de absorción intestinal de ambas formas mercuriales, el cambio en la especie química del Hg puede tener un efecto negativo o positivo dependiendo de la transformación. Así, el paso de CH₃Hg a Hg(II), supone la conversión de una especie de elevada tasa de absorción a una de baja absorción y por tanto tiene un efecto positivo; la transformación contraria tiene un efecto negativo. Por tanto, el ensayo de especiación se realizó al igual que el descrito en el apartado D para confirmar la seguridad de la aplicación de los componentes de la dieta como estrategia para reducir la bioaccesibilidad de Hg.

Los contenidos de Hg(II) y CH₃Hg en las fracciones bioaccesibles obtenidas en presencia de los compuestos alimentarios se compararon con los contenidos de las fracciones obtenidas en ausencia de los mismos.

Compuesto dietario	Concentración (patrones acuosos)	Concentración (alimentos)	Marca
N-acetilcisteína (NAC)	0,4	n.e	Sigma
CaCl ₂ /Fitato dipotásico	0,55/0,11	n.e	Panreac/Sigma
Carboximetilcelulosa (CMC)	0,2	0,2; 0,4	AKUCCELL
λ carragenato	0,2	n.e	Cargill
Catequina	0,04	n.e	Fluka
Quitosano	0,5	0,5; 1,0	Aldrich
Ácido cítrico	0,04	n.e	Panreac
L-Cisteína (Cys)	0,5	n.e	Merck
Gelatina (de piel de cerdo)	0,2	n.e	Sigma
Goma guar	1,0	n.e	Fluka
Goma arábiga (de acacia)	1,0	1,0; 3,0	Fluka
Hidroxipropilcelulosa (HPC)	0,5	0,5; 2,0	Aldrich
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	1,6	1,6; 3,2	Dow Chemical Company
Sulfato de hierro(III) [Fe(III)]	0,048	n.e	Scharlau
(±)-α-Ácido lipoico	0,02	0,02; 0,1	Sigma
Lignina	1,4	0,5; 1,5	Aldrich
Ácido málico	0,8	n.e	Sigma-Aldrich
Metilcelulosa (MC)	1,0	1,0; 3,0	Dow Chemical Company
Ácido oxálico	0,12	n.e	Merck
Pectina (de manzana)	1,0	1,0; 2,0	Sigma

Tabla 7. Compuestos alimentarios empleados en los ensayos de bioaccesibilidad. Concentraciones expresadas en g/100 mL; n.e: no ensayados.

Compuesto dietario	Concentración (patrones acuosos)	Concentración (alimentos)	Marca
Fitato dipotásico	0,5	n.e	Sigma-Aldrich
Saponina	2,0	1,0; 3,0	Santa Cruz
Seleno-D-L-metionina (SeMet)	$0,1 \times 10^{-3}$	n.e	Sigma
Alginato sódico	0,2	n.e	EPSA
Selenato sódico [Se(VI)]	$0,1 \times 10^{-3}$	n.e	Merck
Ácido tánico	3,2	0,5; 1,0	Merck
Goma xantana (<i>Xanthomonas campestris</i>)	1,0	n.e	Sigma
Xilano (de copos de avena)	1,5	1,5; 3,0	Sigma

Tabla 7. Continuación.

8.2. Influencia de las bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* en la bioaccesibilidad de mercurio

Las cepas de bacterias lácticas empleadas en el presente estudio se muestran en la tabla 8. Las bacterias se crecieron en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (BD Difco) a 30 °C en condiciones estáticas. Para los ensayos que se describen a continuación, las células se lavaron con PBS y tras centrifugación (4000 rpm, 10 min, 4 °C), se resuspendieron en el medio adecuado para el análisis.

Las cepas de *S. cerevisiae* se describen en la tabla 9. Las levaduras fueron mantenidas en medio YPD (Yeast Peptone Dextrosa) constituido por 0,5% (m/v) de extracto de levadura, 1% (m/v) de peptona bacteriológica y 2% (m/v) de glucosa (Sigma). Para los ensayos de bioaccesibilidad se lavaron con PBS y tras centrifugación (4000 rpm, 2 min) se resuspendieron en el medio de ensayo.

Designación	Nombre	Origen
BL299	<i>L. plantarum</i> 299V (DSM ^a 9843)	Intestino humano
BL36	<i>L. brevis</i> ATCC ^b 14869	Intestino humano
BL17	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Intestino humano
BL166	<i>L. plantarum</i> WCFS1	Intestino humano (Kleerebezem <i>et al.</i> , 2003)
BL259	<i>L. reuteri</i> BL ^c 259	Ciego de rata
BL23	<i>L. casei</i> BL23	Cepa de laboratorio (Mazé <i>et al.</i> , 2010)
BL377	<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Intestino humano
BL5	<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	Intestino humano
BL260	<i>L. intestinalis</i> BL260	Ciego de rata
BL327	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	Cavidad oral humana

Tabla 8. Cepas de bacterias lácticas ensayadas. ^aDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ^bAmerican Type Strain Culture Collection, ^cColección del laboratorio de bacterias lácticas y probióticos [Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)].

Cepa	Nombre	Características
1	BY4741	Cepa de laboratorio haploide
2	BY4743	Cepa de laboratorio diploide
3	T73	Cepa vínica
4	VRB	Cepa productora de manoproteínas
5	Ultralevura	Cepa dietética (UPSAMÉDICA SL)
6	YPS128	Cepa silvestre americana
7	UWOPS03-461.4	Cepa silvestre de Malasia
8	Kyokai 6	Cepa de sake

Tabla 9. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ensayadas. Cepas procedentes del laboratorio de Biología de sistemas en levaduras de interés biotecnológico (IATA-CSIC).

Las cepas de bacterias lácticas ensayadas en este estudio fueron previamente evaluadas en un estudio colaborativo realizado entre el laboratorio de Elementos Traza donde he desarrollado mi tesis doctoral y el laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos del IATA-CSIC. Este estudio evidenció que todas las cepas eran capaces de reducir la solubilidad de Hg(II) y CH₃Hg en disoluciones acuosas (54-100%) y que esta unión era inmediata para ambas especies (Alcántara *et al.*, 2017). Para *S. cerevisiae*, se desconocía sin embargo su capacidad de unión y los parámetros que podían influir en la misma, por lo que fue necesario realizar un ensayo previo. Así, se investigó la capacidad de unión de la cepa BY4741 de levadura a las formas mercuriales y el tiempo, el pH y la temperatura óptimos. Las levaduras a una concentración aproximadamente 5×10^7 células/mL [4 DO (densidad óptica)/mL], se incubaron en agitación con 10 mL de las disoluciones patrón de cada especie mercurial (1 mg/L) a distintas temperaturas (30 y 37 °C) y en el caso de 37 °C a diferentes tiempos (30, 60 y 120 min) y pHs (2, 3, 4, 5 y 6). Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 2 min. El contenido de Hg en el sobrenadante y en el pellet celular se analizó según el protocolo descrito en el apartado 4.

Una vez determinada su capacidad para unir Hg, todas las cepas de bacterias [4 OD/mL, aproximadamente 1×10^9 UFC (unidades formadoras de colonias)/mL] y levaduras (4 DO/mL) se pusieron en contacto con los patrones acuosos de Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) y el conjunto fue sometido a la digestión gastrointestinal, tal y como se describe en el apartado 3, para determinar la bioaccesibilidad en cada condición aplicando la ecuación 1. Posteriormente, se estudió el efecto de las bacterias y levaduras en la bioaccesibilidad de muestras de alimentos (pez espada y setas deshidratadas). Estos ensayos se realizaron inicialmente con *Lactobacillus casei* (BL23) y la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*.

Teniendo en cuenta que en algunas matrices alimentarias se observó un efecto de las bacterias y las levaduras diferente al puesto de manifiesto en patrones

acuosos, hecho que no ocurría cuando se ensayaron compuestos alimentarios (apartado 8.1), se evaluaron una serie de factores que pudiesen contribuir a estas diferencias. Estos estudios se realizaron empleando *Lactobacillus casei* (BL23) y la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, excepto en el estudio del efecto de la cepa (punto E). Los factores ensayados fueron los siguientes:

A) Efecto de la etapa digestiva. Se evaluó el efecto de la etapa del proceso digestivo en la retención de Hg por BL23 y BY4741. Este ensayo se llevó a cabo con muestras cocinadas de pez espada y setas. Tras la adición de los microorganismos (4 DO/mL), parte de la muestra se sometió únicamente a la etapa gástrica y el resto se sometió a la etapa gastrointestinal completa. En ambos casos se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.

B) Efecto de la cantidad de bacterias lácticas o *S. cerevisiae*. Se trabajó a tres densidades ópticas para las bacterias (7, 10 y 15 DO/mL) y a dos para las levaduras (7 y 10 DO/mL). Este estudio se llevó a cabo empleando muestras cocinadas de pez espada y setas, a las cuales se les adicionó la cantidad correspondiente de bacterias lácticas o *Saccharomyces* y el conjunto fue sometido al proceso de digestión gastrointestinal descrito en el apartado 3.

C) Efecto de la presencia de L-cisteína (Cys) y albumina de suero bovino (BSA). Se realizaron dos aproximaciones diferentes. Inicialmente las disoluciones de Hg(II) o CH₃Hg (1 mg/L) preparadas en PBS fueron adicionadas con Cys (5 mg/L; Sigma) o con BSA (5 mg/L; Biowest, Labclinic) y se incubaron durante 1 h con BL23 o BY4741 (4 OD/mL). Tras la incubación las disoluciones se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. El pellet se recuperó para determinar la captación de Hg por los microorganismos.

En un segundo ensayo, los patrones adicionados con Cys (5 mg/L) o con BSA (5 mg/L) fueron sometidos a una digestión gastrointestinal en presencia de BL23 o BY4741 (4 DO/mL) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.

Posteriormente se determinaron las concentraciones de Hg en la fracción soluble y en el pellet celular.

D) Efecto de cationes divalentes. A disoluciones de Hg(II) o CH₃Hg (1 mg/L) preparadas en PBS, se les adicionó de forma independiente CaCl₂ (100 mg/L; Panreac), CuSO₄ (40 mg/L; Panreac) o FeSO₄ (40 mg/L; Sigma), a las concentraciones habituales en alimentos. La mezcla se incubó durante 2 h con *L. casei* (BL23) o *S. cerevisiae* (BY4741) (4 DO/mL) y se centrifugó a 4000 rpm durante 2 min. El pellet celular y el sobrenadante se recuperaron para determinar la captación de Hg por los microorganismos.

E) Efecto de la cepa de bacterias lácticas y *S. cerevisiae*. Se llevaron a cabo digestiones gastrointestinales con alimentos empleando tres cepas diferentes de bacterias lácticas (BL17, BL259 y BL299; tabla 8) y tres de *S. cerevisiae* (cepa 3, 4 y 5; tabla 9). Estas cepas se adicionaron a las muestras de pez espada y setas y el conjunto se sometió a la digestión gastrointestinal (apartado 3).

9. ESTUDIOS *IN VITRO* SOBRE LOS COMPONENTES DE LA DIETA QUE AFECTAN LA PERMEABILIDAD Y ACUMULACIÓN INTESTINAL DE MERCURIO

9.1. Mantenimiento de los cultivos celulares

En esta tesis se han empleado tres tipos celulares pertenecientes a colon humano; dos líneas aisladas de un adenocarcinoma (Caco-2 y HT29-MTX) y otra línea no transformada (NCM460). Las células Caco-2 se han empleado en monocultivo para los estudios de componentes alimentarios y las NCM460 y HT29-MTX en co-cultivo para los estudios del efecto de bacterias lácticas y *Saccharomyces*. La elección de estos dos modelos celulares para los diferentes estudios se debió principalmente a la magnitud del transporte celular de Hg. Los ensayos iniciales empleando componentes alimentarios se realizaron en monocultivos Caco-2. En

estos ensayos resultó difícil la evaluación del transporte del Hg, principalmente el existente en las fracciones bioaccesibles de pez espada. Teniendo en cuenta este inconveniente, los ensayos con microorganismos se realizaron empleando co-cultivos tras evidenciar que el transporte de Hg en este modelo celular era mayor que en los monocultivos formados por células Caco-2.

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, nº 86010202) y se ensayaron entre los pases 10 y 25. La línea celular NCM460 se adquirió de INCELL Corporation y se empleó entre los pases 15 y 30. Las células HT29-MTX fueron donadas por la Dra. Thécla Lesuffleur (Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR S938, Francia) en el pase 15 y se emplearon entre los pases 17 y 24.

El mantenimiento de estas células se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionó 10 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (4,5 g/L) y L-glutamina (0,6 g/L) a pH 7,2. Para las células Caco-2, el medio se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina, 0,0025 mg/mL de anfotericina B, 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico). A lo largo de la tesis, el medio preparado con esta composición se denominará DMEMc. Para NCM460, el DMEM fue suplementado con 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina, 0,0025 mg/mL de anfotericina B y 10 mM de HEPES (NCM-DMEMc). Finalmente, el medio de las células HT29-MTX se suplementó con 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina, 0,0025 mg/mL de anfotericina B, 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato de sodio para obtener el medio completo que denominamos HT-DMEMc.

Las células se incubaron a 37 °C, en atmósfera controlada con una humedad relativa del 95% y un flujo de CO₂ del 5%. Los medios de cultivo se cambiaron

cada 2-3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron y posteriormente se resembraron a una densidad de 5×10^4 células/cm².

Para la tripsinización se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con PBS. Posteriormente se adicionó la disolución de tripsina (0,5 mg/mL) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA 0,2 mg/mL). La solución de tripsina/EDTA se mantuvo en contacto con las células durante 10-15 min en el incubador. Posteriormente se inactivó la tripsina con DMEM suplementado y se recuperaron las células en un tubo estéril, el cual se centrifugó 5 min a 1400 rpm. Tras la centrifugación, el medio se retiró y el pellet celular se resuspendió en 10 mL de DMEM suplementado. Las células se tiñeron con azul tripán (0,4 % v/v, Sigma) y se contaron en cámara de Neubauer para su posterior siembra.

Los reactivos utilizados para el mantenimiento de los cultivos fueron adquiridos a Hyclone (Fisher).

9.2. Ensayos de viabilidad celular en células intestinales

Previo a los estudios de transporte y acumulación, se evaluó el efecto del Hg sobre la viabilidad de los distintos tipos celulares, con el fin de trabajar en condiciones subletales. Los estudios de viabilidad se basaron en la capacidad de las células viables para reducir resazurina sódica (sal sódica de 10-óxido de 7-hidroxi-3-hidrofenoquinacina-3-ona, Sigma) a resorufina, medibles ambas por métodos colorimétricos. Esta conversión es intracelular, facilitada por oxidoreductasas mitocondriales, citosólicas y microsomales (O'Brien *et al.*, 2000).

Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo en el rango de concentraciones 0,1-2 mg/L durante 4 horas. Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en placas de 24 pocillos en medio DMEM suplementado, cambiando

el medio cada 2-3 días. Tras 7-8 días de siembra, las células se expusieron a los distintos tratamientos en medio esencial mínimo con sales de Earle (MEM) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 0,0025 mg/mL de anfotericina B y 10 mM de HEPES.

Tras la exposición, se retiró el medio y el cultivo se lavó con PBS. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de resazurina sódica (10 μ g/mL en MEM suplementado) y se incubó durante 2 h a 37 °C, 95% humedad relativa y flujo de CO₂ del 5%. Tras la incubación se transfirieron 100 μ L a una placa de 96 pocillos y la reducción de la resazurina se determinó por espectrofotometría con lecturas a 570 y 600 nm (PowerWave HT Microplate Scanning Spectrophotometer, Bio-Tek instruments). Los resultados se expresaron como porcentajes respecto a la absorbancia de las células no tratadas con Hg.

9.3. Evaluación de la permeabilidad aparente del mercurio

9.3.1. Cultivo de las células en sistemas bicamerales. Los ensayos de transporte se realizaron en placas de 6 pocillos con insertos con membrana de poliéster (24 mm diámetro, tamaño de poro de 0,4 μ m; Transwell[®], Corning, Cultek) para las células Caco-2 y en placas de 12 pocillos con insertos (12 mm diámetro, tamaño de poro de 0,4 μ m; Transwell[®]) para los co-cultivos NCM460/HT29-MTX. En este sistema, las células epiteliales se siembran sobre el soporte poroso del inserto que separa el pocillo en dos compartimentos: apical (superior) y basolateral (inferior) (figura 10). Este sistema intenta emular de forma simplificada el entorno de la pared intestinal. La parte apical de la monocapa celular representaría el lumen intestinal, el cual está en contacto con los compuestos procedentes de la dieta. El compartimento basolateral representaría la cavidad serosa, donde llegan los compuestos tras la absorción intestinal.

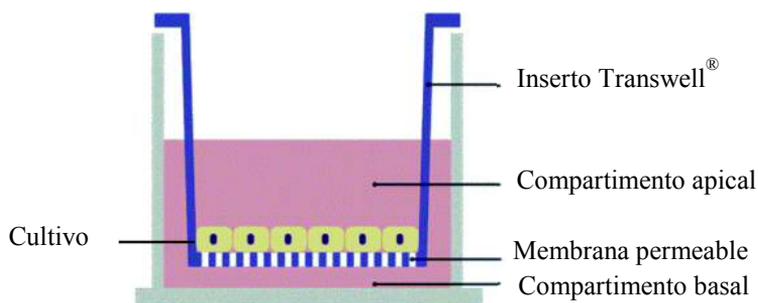


Figura 10. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad con células epiteliales del intestino.

Tras la tripsinización de las células intestinales mantenidas en frascos de 75 cm², tal y como se indica en el apartado 9.1, se procedió a su siembra sobre el inserto de los sistemas bicamerales. Las células Caco-2 se sembraron en las placas de 6 pocillos a una densidad de $7,5 \times 10^4$ células/cm², adicionando 1,5 mL de la suspensión celular en DMEMc al compartimento apical y 2 mL de DMEMc al compartimento basolateral. Para los co-cultivos NCM460/HT29-MTX se ensayó una proporción 80/20. Esta proporción se eligió en base a las proporciones habituales de estos tipos celulares en el intestino delgado, donde las células absortivas son las mayoritarias y las células mucosecretoras representan entre un 10 y 24% (Hilgendorf *et al.*, 2000). Las células combinadas se sembraron a una densidad de $7,5 \times 10^4$ células/cm² en placas de 12 pocillos, adicionando 0,5 mL de la suspensión celular en HT-DMEMc al compartimento apical y 1,5 mL de HT-DMEMc al compartimento basolateral. Las células se incubaron a 37 °C, en atmósfera controlada con 95% de humedad relativa y un flujo de CO₂ del 5% durante 9-11 días, cambiando el medio cada 3 días.

Durante el tiempo de crecimiento, se monitoreó la confluencia y desarrollo de la monocapa celular mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) utilizando un voltímetro Millicell®-ERS (Millipore Corporation) (figura 11).

Debido a que los valores de RET son altamente dependientes de la temperatura, este parámetro se midió inmediatamente después de sacar las células del incubador. En las células Caco-2 se consideró que la monocapa estaba formada cuando los valores de RET fueron estables y superiores o iguales a 250 Ohms cm^2 . En los co-cultivos, los valores de referencia empleados para considerar la monocapa adecuada para los ensayos oscilaron entre 150-170 Ohms cm^2 .



Figura 11. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial. La medida de las monocapas en sistemas Transwell® se realiza empleando un voltímetro Millicell®-ERS.

9.3.2. Tratamiento de las fracciones bioaccesibles para los ensayos de permeabilidad. La fracción soluble procedente de la digestión gastrointestinal no puede adicionarse directamente al cultivo celular. Previamente es necesario inactivar los enzimas proteolíticos utilizados en el proceso y ajustar la osmolaridad de las fracciones solubles a valores fisiológicos que permitan conservar la integridad de la monocapa celular durante el ensayo. Para inactivar las proteasas, la fracción bioaccesible se sometió a un tratamiento térmico a 90 °C durante 4 min. A la fracción soluble inactivada, se le adicionó glucosa (5 mM concentración final, Sigma) para favorecer el mantenimiento de la viabilidad y actividad celular durante los ensayos. Finalmente, la osmolaridad se ajustó a valores entre 270-310

mOsmol/kg, mediante la adición de NaCl 5 M (Panreac), empleando un osmómetro crioscópico Automatic Micro-Osmometer Löser (Löser).

9.3.3. Ensayos de permeabilidad celular. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C, empleando como medio de cultivo la disolución salina de Hanks con NaCO₃ (HBSS, Lonza, Labclinic) suplementada con 10 mM HEPES (pH 7,2). Tras retirar el medio de mantenimiento de los compartimentos, se adicionaron al compartimento apical 1,5 mL (placa de 6 pocillos) o 0,5 mL (placa de 12 pocillos) de los patrones de Hg(II) y CH₃Hg (0,5 µg/mL) preparados en HBSS con 10 mM HEPES o la fracción bioaccesible previamente tratada (apartado 9.3.2), con o sin la adición de los componentes de la dieta (n= 23; tabla 10), suplementos dietéticos (n= 5; tabla 10) o microorganismos de grado alimentario [n= 4, cepas BL23 y BL17 de bacterias lácticas (tabla 8) y cepas 5 y 7 de *S. cerevisiae* (tabla 9)]. En el compartimento apical también se añadió lucifer yellow (LY), compuesto fluorescente que no interfiere en el transporte de Hg (Vázquez *et al.*, 2014a), y cuyo transporte a través de la monocapa es un marcador de integridad de la membrana celular (apartado 9.3.4). En el compartimento basolateral se adicionaron 2 mL (placa de 6 pocillos) o 1,5 mL (placa de 12 pocillos) de medio HBSS con 10 mM HEPES.

Compuestos dietarios/suplementos	Concentración (patrones acuosos)	Concentración (alimentos)	Marca
Glutati3n reducido (GSH)	1 mM	1 mM	Sigma
DL-Homocisteina (HCys)	5 mg/L	5 mg/L	Sigma
L-Cisteina (Cys)	20 mg/L	20 mg/L	Merck
Alb3mina de suero bovino	20 mg/L	n.e	Biowest
Pectina (de manzana)	50 mg/L	n.e	Sigma
Xilano (de copos de avena)	20 mg/L	n.e	Sigma
(\pm)- α - Cido lipoico	10 mg/L	n.e	Sigma
Lipoico reducido (DHLA)	50 mg/L	n.e	Sigma
Sulfato de zinc (Zn)	50 mg/L	n.e	Panreac
Sulfato de hierro(II) [Fe(II)]	50 mg/L	n.e	Sigma
Selenato s3dico [Se(VI)]	0,5 mg/L	n.e	Merck
Cido t3nico	20 mg/L	20 mg/L	Merck
L-Arginina (Arg)	20 mg/L	n.e	Sigma
L-Fenilalanina (Phe)	20 mg/L	n.e	Merck
Lys + Phe	20 mg/L	n.e	Merck
L-Metionina (Met)	20 mg/L	n.e	Merck
Dextrina de almid3n de ma3iz	10 mg/L	n.e	Sigma
Catequina monohidratada	5 mg/L	n.e	Fluka
Lisina monohidrato (Lys)	20 mg/L	n.e	Merck
Lecitina granular	10 mg/L	n.e	Sigma
Quercetina dihidratada	5 mg/L	5 mg/L	Sigma
Tiamina hidrocloreuro	25 mg/L	n.e	Sigma
Epigalocatequina	5 mg/L	n.e	Sigma
Suplemento de benfotiamina	100 mg/L	n.e	Life extension
Suplemento de cido lipoico	100 mg/L	n.e	Life extension
Suplemento de GSH/Cys	100 mg/L	100 mg/L	Life extension
Extracto de t3 verde	100 mg/L	100 mg/L	Plantextrakt
Extracto de semilla de uva	100 mg/L	100 mg/L	Plantextrakt

Tabla 10. Componentes alimentarios, suplementos diet3ticos o extractos vegetales empleados en los estudios de permeabilidad celular. n. e., no ensayados.

A los tiempos establecidos (45, 90 y 120 min para patrones acuosos y 60, 120 y 180 min para las fracciones bioaccesibles), se retiraron alícuotas (0,7-1 mL) del compartimento basolateral y se sustituyeron por un volumen igual de medio fresco (HBSS con 10 mM HEPES).

En las alícuotas recogidas a cada tiempo se procedió a la cuantificación de Hg, tal y como se describe en el apartado 4. Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) se calcularon utilizando la ecuación 3.

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V_r}{A C_o} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde,

dC/dt es el flujo ($\mu\text{g/s}$) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que rige la variación de las concentraciones de Hg, corregidas con la dilución, frente al tiempo.

V_r es el volumen del compartimento aceptor (2 mL para placas de 6 pocillos y 1,5 mL para placas de 12 pocillos).

A es la superficie ocupada por la monocapa celular ($4,71 \text{ cm}^2$ para placas de 6 pocillos y $1,12 \text{ cm}^2$ para placas de 12 pocillos).

C_o es la concentración inicial de las especies mercuriales añadida en el compartimento dador ($0,5 \mu\text{g/mL}$ para patrones).

9.3.4. Control de la integridad de la monocapa durante los ensayos de permeabilidad. La integridad de la monocapa celular se determinó a través de la medición de tres parámetros: a) la RET; b) el P_{app} del marcador fluorescente paracelular LY; c) la viabilidad celular al final del ensayo.

La RET se midió al inicio de la experiencia y en todos los tiempos de toma de muestra, tal y como se describe en el apartado 9.3.1. Para evaluar el transporte de LY, este marcador se adicionó a una concentración de 100 μM al compartimento apical de los pocillos. La fluorescencia del LY en las alícuotas recogidas a cada tiempo del lado basolateral se midió empleando un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA reader, BMG-Labtech) a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/520 nm. El cálculo del P_{app} se realizó aplicando la ecuación 3.

La viabilidad celular se determinó en las células recogidas mediante tripsinización al final del ensayo. Se utilizó la técnica de tinción con azul tripán 0,4% (v/v) empleando una cámara de Neubauer y visualización en microscopio óptico invertido (OPTIKA XDS-1R).

Se consideraron válidos los ensayos de transporte cuando se cumplieron las siguientes condiciones: a) cambios inferiores al 25% en la RET respecto a los valores iniciales; b) P_{app} del LY $< 2 \times 10^{-7}$ cm/s para monocultivos Caco-2 y $< 1 \times 10^{-6}$ cm/s para co-cultivos NCM460/HT29-MTX (80/20); c) viabilidad celular $\geq 80\%$.

10. ESTUDIOS *IN VIVO* DE LA BIODISPONIBILIDAD DE MERCURIO Y EL EFECTO DE LAS ESTRATEGIAS DIETARIAS

Para llevar a cabo esta investigación se seleccionaron 96 ratones de la raza BALB/c, procedentes de Charles River (España). Los animales se adquirieron con una edad comprendida entre 4 y 5 semanas y con un peso que oscilaba entre 20 y 30 g. Las condiciones ambientales en las que se mantuvieron los animales a lo largo de todo el estudio fueron constantes: doce horas de luz (desde las 8 a las 20 h) y doce de oscuridad (desde las 20 a las 8 h); temperatura ambiental de 22° C; humedad del recinto de un 75%. Los ratones se alimentaron con pienso de mantenimiento

estándar para roedores. Tras dos semanas de aclimatación, se iniciaron los ensayos de biodisponibilidad, acumulación y excreción que se describen a continuación.

El protocolo de experimentación al que fueron sometidos los animales se diseñó conforme a la normativa para el uso de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) y fueron autorizados por la Universidad de Valencia con la consiguiente aprobación de la Consellería de d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana.

10.1. Evaluación de la concentración plasmática de Hg en función de la dosis empleada

En este ensayo inicial se emplearon 4 animales por grupo para establecer las concentraciones de Hg(II) y CH₃Hg a utilizar. Las disoluciones de Hg(II) o CH₃Hg se prepararon en PBS y se dosificaron por sonda intragástrica a 3 concentraciones (0,1; 0,5 y 1,0 mg por kg pc). La sangre fue obtenida por punción en el seno venoso submandibular (≈ 0.1 mL) a distintos tiempos (0, 60, 300 y 1440 min). Las muestras fueron recogidas en tubos con heparina (Microvette, Sarstedt) y rápidamente centrifugados a 2000 rpm durante 5 min a 4 °C para obtener el plasma. Las muestras de plasma fueron digeridas en horno microondas y la cantidad de mercurio se evaluó por CV-AFS (apartado 4).

10.2. Tratamiento con los componentes alimentarios

Una vez fijadas las condiciones óptimas de toma de muestras y los niveles de dosificación, se pasó a evaluar *in vivo* aquellos compuestos de la dieta que podrían reducir la cantidad de Hg en plasma tras una ingesta oral de Hg(II) y CH₃Hg (figura 12). Los componentes seleccionados en base a los estudios previos fueron el ácido tánico (30 mg/kg pc), la Cys (4 mmol/kg pc) y la HPMC (15 mg/kg pc). Estos se

co-administraron con las especies de Hg [0,1 mg/kg pc/día para CH₃Hg y 1 mg/kg pc/día para Hg(II)]. La disolución componente alimentario/especie mercurial en PBS se preparó inmediatamente antes de la administración para evitar posibles precipitaciones. Tras la dosificación inicial se recogieron muestras de sangre (≈ 0.1 mL) a los tiempos preestablecidos para obtener el plasma y determinar la biodisponibilidad relativa, tal y como se describe en el apartado 10.4.

La dosificación se realizó durante 3 días consecutivos con el fin de evaluar tras el sacrificio, la acumulación de ambas especies mercuriales en hígado, riñones y cerebro. Adicionalmente se recogieron muestras individuales de heces, 5 y 24 h después de la primera administración.

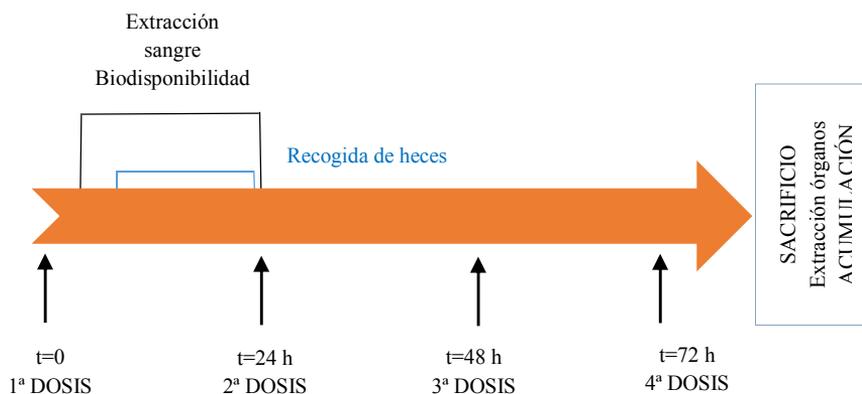


Figura 12. Esquema de dosificación y toma de muestras en el estudio del efecto de los componentes alimentarios sobre la biodisponibilidad *in vivo*.

10.3. Tratamiento con las bacterias lácticas

El estudio con bacterias lácticas se realizó con dosificaciones iniciales de los microorganismos durante 5 días previo a la exposición con Hg(II) y CH₃Hg. Se ha descrito que el empleo de cepas de bacterias lácticas como terapéuticos, es decir

previo a la exposición a un xenobiótico o patógeno, es en la mayoría de las ocasiones más beneficioso que la co-administración o la dosificación de estos microorganismos a posteriori (Frizzo *et al.*, 2010; Zhai *et al.*, 2013). Por este motivo se realizó una pre-exposición diaria con las bacterias lácticas (BL23 y BL17, ver tabla 8) seleccionadas a una concentración de 1×10^9 UFC /mL. El resto del procedimiento fue similar al descrito en el apartado 10.2, exceptuando que el tratamiento con Hg se realizó durante 2 días (figura 13).

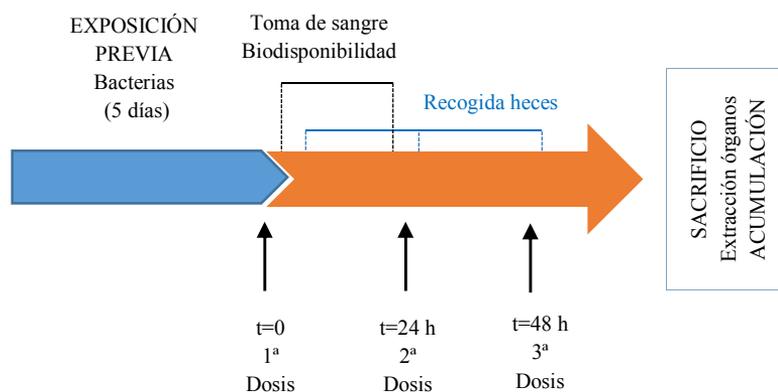


Figura 13. Esquema de dosificación y toma de muestras en el estudio del efecto de bacterias lácticas sobre la biodisponibilidad *in vivo*.

10.4. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

Los contenidos de Hg en plasma en la condición de referencia [animales expuestos a Hg(II) o CH₃Hg] y los tratamientos donde se administraban estas formas mercuriales con compuestos alimentarios o bacterias lácticas permitieron el cálculo de la biodisponibilidad relativa, aplicando la ecuación 4.

$$F\% = \frac{AUC_a}{AUC_{\text{referencia}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde el subíndice a indica la AUC para los tratamientos conjuntos Hg/compuesto alimentario o bacterias lácticas. Las AUC orales de cada tratamiento fueron calculadas empleando el programa SigmaPlot (versión 13) a partir de la representación de la concentración plasmática de Hg en función del tiempo.

Adicionalmente se llevó a cabo la recogida de muestras de heces, para determinar la influencia de los componentes alimentarios o microorganismos en la magnitud de la excreción por esta vía, considerada mayoritaria especialmente para el Hg(II), tal y como se indica en la introducción (apartado 8.4). Estas muestras fueron digeridas por horno microondas y posteriormente el Hg determinado por CV-AFS (apartado 4).

Estos parámetros farmacocinéticos permitieron determinar el efecto de los compuestos alimentarios o microorganismos de grado alimentario sobre la biodisponibilidad y excreción *in vivo* de las formas mercuriales.

10.5. Sacrificio y extracción de órganos

Transcurrido el tiempo de exposición, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico y la sangre se recogió por punción cardiaca. Posteriormente se extrajeron los órganos de interés (hígado, riñones, intestino y cerebro). Las muestras tisulares tras limpiarlas con solución salina, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se digirieron en horno microondas y se analizaron por CV-AFS, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó aplicando la prueba t-student o el análisis de la varianza con un sólo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Tukey HSD (SigmaPlot, versión 13.5). Las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0,05$.

La determinación del tamaño muestral necesario para los ensayos de biodisponibilidad, excreción y acumulación *in vivo* (capítulo 5) se llevó a cabo empleando el programa GPower 3.1, con un $\alpha = 0,05$ y un poder estadístico $(1-\beta)$ de 0,9.

Capítulo 1

Caracterización de la fracción bioaccesible de mercurio de alimentos y evaluación del riesgo asociado

El objetivo de este capítulo ha sido la caracterización de la fracción bioaccesible de los alimentos con mayores contenidos de Hg y la evaluación del riesgo asociado. Esta fracción se ha caracterizado teniendo en cuenta una serie de parámetros y eligiendo como matrices alimentarias pez espada y setas deshidratadas pertenecientes a distintas especies.

Se han determinado los contenidos totales de Hg y las formas químicas predominantes en el alimento y en su fracción bioaccesible. Las formas mercuriales en estos alimentos han sido evaluadas previamente en numerosos estudios, sin embargo, son escasas las investigaciones donde se muestre la especiación de las fracciones solubles obtenidas tras su digestión gastrointestinal. Adicionalmente y dentro de la caracterización del riesgo asociado a la ingesta, se ha analizado el contenido de Se. Tal y como se ha indicado en la introducción (apartado 7.5), el ratio molar Se/Hg es un cociente que puede indicar si el producto presenta un mayor o menor riesgo toxicológico. Según los estudios llevados a cabo en animales de laboratorio un exceso molar de Se respecto a Hg supone una menor toxicidad sistémica del metal. Finalmente, se han investigado el efecto que las condiciones fisiológicas de la digestión gastrointestinal (cambios de pHs, de concentraciones de enzimas o tiempos de residencia) ejercen sobre la liberación del Hg de la matriz evaluando en todas ellas el ratio molar Se/Hg.

El conocimiento de estos parámetros permite una mejor evaluación del riesgo asociado a la ingesta de un determinado alimento y además puede ser utilizado para la búsqueda de estrategias que reduzcan la biodisponibilidad oral de Hg. Adicionalmente puede permitir un análisis y una interpretación más certeros de los resultados que se van a ir obteniendo en los siguientes capítulos de esta tesis.

RESULTADOS

1. CONTENIDOS DE MERCURIO Y SELENIO EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

Las tablas 11 y 12 muestran los contenidos de Hg y Se en las muestras de pez espada cocinado (n=15) y setas deshidratadas (n=10) respectivamente, así como los ratios molares Se/Hg. Los contenidos de Hg en pez espada oscilan entre 0,39 y 2,82 mg/kg peso húmedo (ph), con una mediana de 0,92 mg/kg ph. Estos valores son 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; Branco *et al.*, 2007; Torres Escribano *et al.*, 2010; Calatayud *et al.*, 2012). La única forma química de Hg detectada en el análisis de las muestras de pez espada es el CH₃Hg. Esta forma mercurial posiblemente esté unida a grupos tiol de aminoácidos en proteínas, polipéptidos o péptidos de pequeño tamaño como el GSH, tal y como indica Harris *et al.* (2003) en un estudio llevado a cabo empleando espectroscopia de rayos X. El 40% de las muestras analizadas superan el límite de Hg permitido por la legislación vigente en España para esta especie de pescado (1 mg/kg ph) (Reglamento 420/2011).

Los contenidos de Se en las muestras de pez espada oscilan entre 0,38 y 0,98 mg/kg ph, con una mediana de 0,58 mg/kg ph. Las relaciones molares Se/Hg varían entre 0,44 y 3,49 mg/kg ph, con una mediana de 1,84 mg/kg ph. De todas las muestras analizadas, el 20% presenta un ratio molar Se/Hg menor a la unidad, es decir un exceso molar de Hg. De las 6 muestras que superan el límite legislado para Hg, sólo 3 tienen un ratio molar menor a la unidad. Otros estudios también muestran que productos pesqueros correspondientes a peces depredadores con concentraciones de Hg superiores a la legislada y que por tanto no podrían comercializarse, presentan ratios molares Se/Hg superiores a la unidad (Plessi *et al.*, 2001; Kaneko y Ralston, 2007; Burger y Gochfeld, 2011), que según los datos

experimentales derivados de los ensayos *in vivo*, conllevan un riesgo toxicológico inferior.

Las concentraciones de Hg halladas en setas oscilan entre 0,17 y 3,45 mg/kg peso seco (ps), con una mediana de 1,58 mg/kg ps. Las especies que presentan los valores más elevados son *Boletus edulis* y *Tricholoma georgii*. Estudios previos han puesto de manifiesto que los contenidos de Hg de estas especies son sistemáticamente elevados pudiendo llegar a alcanzar concentraciones del orden de 20 mg/kg ps (Kalač y Svoboda, 2000; Falandysz y Bielawski, 2001). El estudio de especiación ha evidenciado que la totalidad del Hg detectado en este producto vegetal es inorgánico. En Europa únicamente se limita el contenido de Hg en productos de la pesca y suplementos (Reglamento 420/2011). Otros países, sin embargo, sí disponen de recomendaciones de contenidos máximos en setas. Así, por ejemplo, China limita a 0,1 mg/kg el contenido de Hg en el producto fresco, indicando que en productos deshidratados debe realizarse la correspondiente corrección del contenido en agua, lo que supone un límite en torno a 1 mg/kg ps (China's Ministry of Health, 2012). El 55% de las muestras analizadas supera el límite establecido en China para setas deshidratadas.

Los contenidos en Se en setas son iguales o superiores a los de Hg para la mayoría de las muestras (0,26-22,09 mg/kg ps; mediana: 2,22 mg/kg ps), destacando los valores encontrados en *Boletus edulis*. La relación molar Se/Hg es superior a la unidad en todas las muestras analizadas, con valores muy superiores a los observados en pez espada (2,49-30,83; mediana; 4,23). Así, al igual que en pez espada, aunque se trata de muestras que pueden tener contenidos de Hg superiores a los legislados, el exceso molar de Se podría reducir el riesgo asociado a su ingesta.

Muestra	Hg	Se	Se/Hg
1	2,82 ± 0,27	0,49 ± 0,04	0,44
2	0,42 ± 0,02	0,50 ± 0,03	3,04
3	1,27 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,93
4	0,92 ± 0,01	0,67 ± 0,07	1,84
5	1,41 ± 0,08	0,63 ± 0,01	1,14
6	0,39 ± 0,07	0,38 ± 0,03	2,87
7	1,25 ± 0,04	0,51 ± 0,03	1,32
8	1,19 ± 0,02	0,45 ± 0,01	2,26
9	0,62 ± 0,05	0,71 ± 0,03	3,49
10	1,88 ± 0,18	0,98 ± 0,12	2,50
11	0,42 ± 0,01	0,58 ± 0,03	1,03
12	0,91 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,96
13	0,73 ± 0,02	0,66 ± 0,02	2,88
14	1,67 ± 0,08	0,53 ± 0,01	1,59
15	0,89 ± 0,01	0,73 ± 0,08	2,08

Tabla 11. Contenidos de Hg y Se y ratio molar Se/Hg en muestras de pez espada. Concentraciones expresadas como mg/kg ph (media ± SD, n=3).

Especie	Hg	Se	Se/Hg
<i>Amanita caesarea</i>	1,68 ± 0,04	2,17 ± 0,09	3,28
<i>Amanita ponderosa</i>	0,28 ± 0,03	0,32 ± 0,03	2,88
<i>Amanita ponderosa</i>	0,17 ± 0,06	0,26 ± 0,03	3,90
<i>Boletus edulis</i>	1,82 ± 0,06	22,09 ± 0,35	30,83
<i>Boletus edulis</i>	1,58 ± 0,12	15,94 ± 1,87	25,63
<i>Lactarius deliciosus</i>	0,22 ± 0,01	0,92 ± 0,04	10,65
<i>Lepiota procera</i>	0,51 ± 0,02	2,26 ± 0,06	11,28
<i>Marasmius oreades</i>	1,58 ± 0,07	1,55 ± 0,08	2,49
<i>Tricholoma georgii</i>	2,19 ± 0,11	3,93 ± 0,06	4,56
<i>Tricholoma georgii</i>	3,45 ± 0,02	4,22 ± 0,12	3,10

Tabla 12. Contenidos de Hg y Se y ratio molar Se/Hg en muestras de setas deshidratadas. Concentraciones expresadas como mg/kg ps (media ± SD, n=3).

2. BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO Y SELENIO EN ALIMENTOS

Las tablas 13 y 14 muestran los contenidos de Hg y Se presentes en la fracción bioaccesible y el ratio molar Se/Hg de esta fracción para muestras de pez espada cocinado y setas deshidratadas, respectivamente. La bioaccesibilidad de Hg varía considerablemente entre muestras de pez espada (15-85%), con una mediana de 37%. Los contenidos de la fracción bioaccesible oscilan entre 0,07 y 1,54 mg/kg (mediana: 0,33 mg/kg). Si se considera la fracción bioaccesible, un 20% de las muestras superan el límite de 1 mg/kg legislado para producto fresco (Reglamento 420/2011). El paso del alimento por el proceso digestivo no conlleva cambios en el estado de metilación de la forma mercurial, ya que la única especie mercurial detectable es el CH₃Hg (datos no mostrados), al igual que ocurría en la muestra cocinada.

Los contenidos bioaccesibles de Se en pez espada varían entre 0,24 y 0,94 mg/kg, con una mediana de 0,51 mg/kg. La bioaccesibilidad del Se (63-103%; mediana: 96%) es, en general, mayor que la observada para el Hg, hecho que ya documentan otros estudios en la misma especie de pescado (Cabañero *et al.*, 2004; Calatayud *et al.*, 2012). En todas las muestras analizadas la concentración molar soluble de Se supera a la de Hg haciendo que el ratio molar Se/Hg sea superior a la unidad (1,04-12,93; mediana: 3,91) y evidenciando un menor riesgo asociado al producto alimentario tras la digestión.

La bioaccesibilidad de Hg en muestras de setas oscila entre 11 y 35%, con una mediana de 23%. Los contenidos de la fracción bioaccesible varían entre 0,05 y 0,61 mg/kg ps (mediana: 0,28 mg/kg ps). Los porcentajes de extracción y solubilización del Hg en esta matriz alimentaria son inferiores a los obtenidos para muestras de pez espada. En este caso, si se considera el límite de 1 mg/kg ps, ninguna de las muestras superaría el mismo, lo que supone una reducción del riesgo asociado a la ingesta. Esta situación es todavía más favorable si se considera que la bioaccesibilidad del Se (57-87%; mediana: 66%) es superior a la del Hg y los valores de los ratios molares Se/Hg son mayores a la unidad en las fracciones bioaccesibles de todas las muestras (8,32-71,43; mediana: 15,97). Al igual que ocurre con el pez espada, el proceso digestivo no influye sobre la especiación del Hg ya que la especie mayoritaria es Hg inorgánico (datos no mostrados), perfil similar al observado en la muestra previo a su digestión.

Muestra	Hg	Se	Se/Hg
1	0,43 ± 0,02 (15%)	0,45 ± 0,04 (92%)	2,66
2	0,21 ± 0,04 (51%)	0,51 ± 0,03 (101%)	6,17
3	1,07 ± 0,08 (85%)	0,44 ± 0,01 (94%)	1,04
4	0,27 ± 0,03 (29%)	0,42 ± 0,06 (63%)	3,95
5	0,28 ± 0,03 (20%)	0,42 ± 0,04 (66%)	3,81
6	0,07 ± 0,01 (17%)	0,24 ± 0,002 (64%)	8,71
7	0,46 ± 0,001 (37%)	0,46 ± 0,03 (90%)	2,54
8	0,90 ± 0,01 (76%)	0,46 ± 0,02 (103%)	1,30
9	0,45 ± 0,01 (73%)	0,69 ± 0,02 (98%)	3,90
10	1,54 ± 0,02 (82%)	0,94 ± 0,03 (96%)	1,55
11	0,11 ± 0,004 (27%)	0,56 ± 0,02 (97%)	12,93
12	0,33 ± 0,003 (36%)	0,54 ± 0,001 (96%)	4,16
13	0,33 ± 0,001 (45%)	0,52 ± 0,02 (79%)	4,00
14	1,09 ± 0,02 (65%)	0,52 ± 0,03 (99%)	1,21
15	0,24 ± 0,003 (27%)	0,73 ± 0,04 (101%)	7,73

Tabla 13. Bioaccesibilidad de Hg y Se en muestras de pez espada. Concentración de Hg y Se en las fracciones bioaccesibles (mg/kg ph), bioaccesibilidad (entre paréntesis) y ratio molar Se/Hg en las fracciones bioaccesibles. Valores expresados como media ± SD (n=3).

Especie	Hg	Se	Se/Hg
<i>Amanita caesarea</i>	0,37 ± 0,01 (22%)	1,42 ± 0,07 (65%)	9,86
<i>Amanita ponderosa</i>	0,07 ± 0,01 (23%)	0,21 ± 0,02 (67%)	8,32
<i>Amanita ponderosa</i>	0,05 ± 0,01 (32%)	0,23 ± 0,01 (87%)	10,73
<i>Boletus edulis</i>	0,61 ± 0,08 (33%)	17,07 ± 0,08 (77%)	71,43
<i>Boletus edulis</i>	0,50 ± 0,08 (35%)	9,39 ± 0,41 (59%)	48,17
<i>Lactarius deliciosus</i>	0,06 ± 0,001 (30%)	0,53 ± 0,01 (57%)	21,21
<i>Lepiota procera</i>	0,14 ± 0,03 (27%)	1,36 ± 0,13 (60%)	24,79
<i>Marasmius oreades</i>	0,33 ± 0,03 (21%)	1,29 ± 0,08 (83%)	10,11
<i>Tricholoma georgii</i>	0,23 ± 0,02 (11%)	3,02 ± 0,60 (77%)	32,97
<i>Tricholoma georgii</i>	0,61 ± 0,07 (18%)	2,43 ± 0,39 (58%)	10,06

Tabla 14. Bioaccesibilidad de Hg y Se en muestras de setas deshidratadas. Concentración de Hg y Se en las fracciones bioaccesibles (mg/kg ps), bioaccesibilidad (entre paréntesis) y ratio molar Se/Hg en las fracciones bioaccesibles. Valores expresados como media ± SD (n=3).

3. INFLUENCIA DE LA ETAPA DIGESTIVA SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO Y SELENIO

La figura 14 muestra los contenidos de Hg en las muestras de pez espada, así como los contenidos de las fracciones bioaccesibles tras someter el alimento a una digestión gástrica o gastrointestinal completa. 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 que varían entre 0,21 y 1,07 mg/kg ph, lo que indica que durante la etapa intestinal hay una reducción del contenido soluble (reducción: 17-58%).

Los contenidos de Se en la fracción procedente de la digestión gástrica de pez espada oscilan entre 0,46 y 0,53 mg/kg ph. Tras la digestión gástrica se solubiliza entre un 75% y un 100% del Se presente en el pez espada. Los contenidos de Se bioaccesible tras aplicar la digestión gastrointestinal completa (0,42-0,51 mg/kg ph) son similares a los obtenidos durante la etapa gástrica (datos no mostrados).

A diferencia de lo observado en pez espada, la bioaccesibilidad del Hg y Se en setas no se modifica al incorporar la etapa intestinal en la digestión (datos no mostrados).

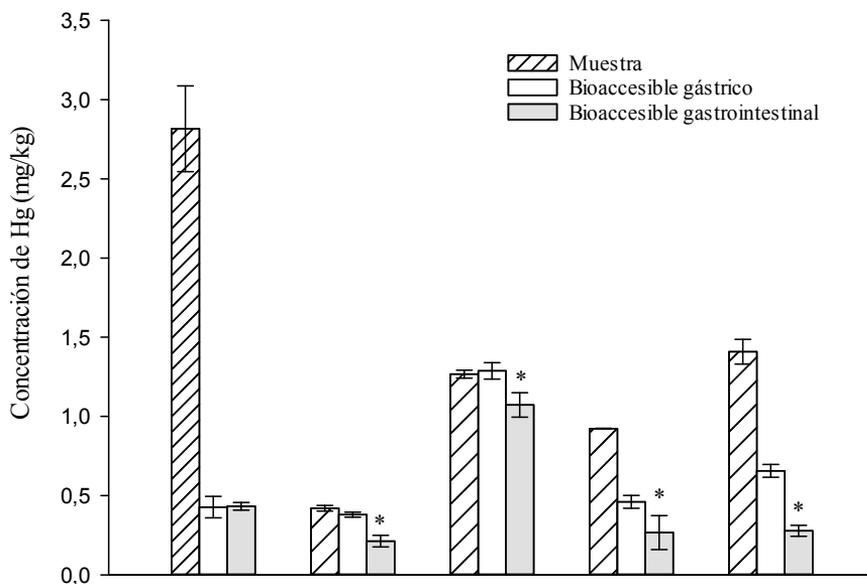


Figura 14. Influencia de la etapa de digestión en la bioaccesibilidad de Hg en pez espada. Concentraciones expresadas como mg/kg (media \pm SD, n=4). Cada grupo de barras corresponde a una muestra de pez espada. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los contenidos bioaccesibles de la etapa gastrointestinal respecto a la gástrica para cada muestra.

Los resultados de este ensayo muestran que la solubilización del Hg y Se en el pez espada y setas se produce principalmente durante la etapa gástrica. Durante la etapa intestinal no aumenta la solubilización de estos elementos, incluso en el caso de Hg en pez espada se produce un importante descenso de los contenidos en la fracción soluble respecto a los hallados en la etapa gástrica.

4. INFLUENCIA DE PARÁMETROS DE LA ETAPA GÁSTRICA EN LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO Y EN EL RATIO MOLAR SELENIO/MERCURIO

4.1. pH gástrico

Tras la ingesta de un alimento 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 ensayos se han llevado a cabo en este rango de pHs. La figura 15 muestra el porcentaje de bioaccesibilidad del Hg (15A) y Se (15B) tras aplicar a muestras de pez espada distintos pHs en la etapa gástrica (pH 2, 3, 4). Los resultados ponen de manifiesto que el pH es un factor determinante en esta matriz, especialmente en la bioaccesibilidad del Hg, ya que a pH mayores o iguales a 3 este elemento traza apenas se solubiliza durante la digestión. En concreto, la bioaccesibilidad de Hg a pH 3 se reduce un 82% respecto a los valores obtenidos a pH 2.

Para el Se, el descenso es menos acentuado, con reducciones entre 33 y 51% a pH 4 con respecto a pH 2. Las modificaciones de la bioaccesibilidad de estos dos elementos en función del pH en pez espada supone que el ratio molar Se/Hg se incrementa con el aumento del pH, alcanzando valores muy elevados a pH 4 (54-528); a estos pHs el exceso molar de Se es considerable, y por tanto la reducción del riesgo asociado a la ingesta.

En las muestras de setas, el aumento del pH también produce una reducción importante de la bioaccesibilidad del Hg, menos acentuada en la muestra de *Boletus edulis* (38-44%) que en *Tricholoma georgii* (68-80%) (figura 16). Para el Se, no hay cambios de bioaccesibilidad en función del pH (datos no mostrados), de modo que a medida que aumenta el pH se incrementa el ratio molar Se/Hg. Por tanto, para esta matriz alimentaria, un mayor pH gástrico también podría conllevar una reducción del riesgo asociado a la ingesta.

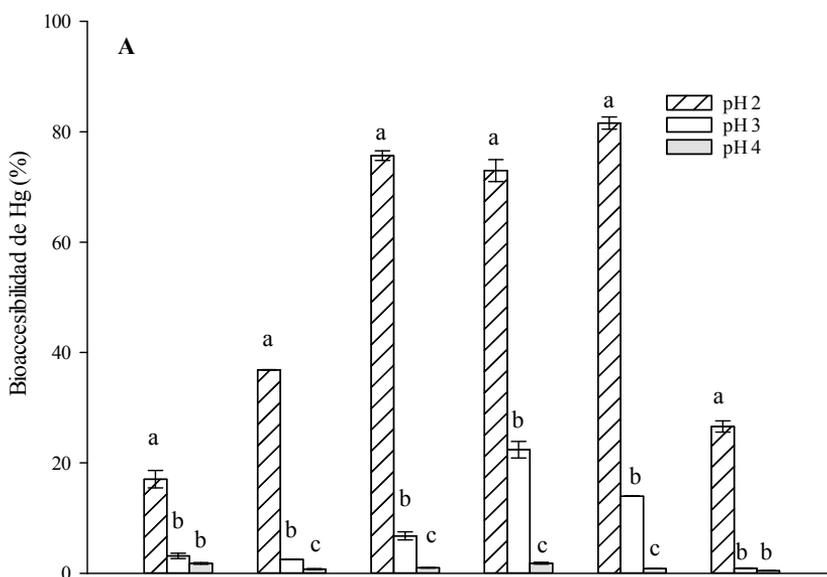


Figura 15. Influencia del pH gástrico en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada. Bioaccesibilidad del Hg (15A) y Se (15B) expresada como porcentaje respecto al contenido inicial del producto (media \pm SD, n=4). Cada grupo de barras corresponde a una muestra de pez espada. Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los contenidos bioaccesibles a distintos pH para una misma muestra.

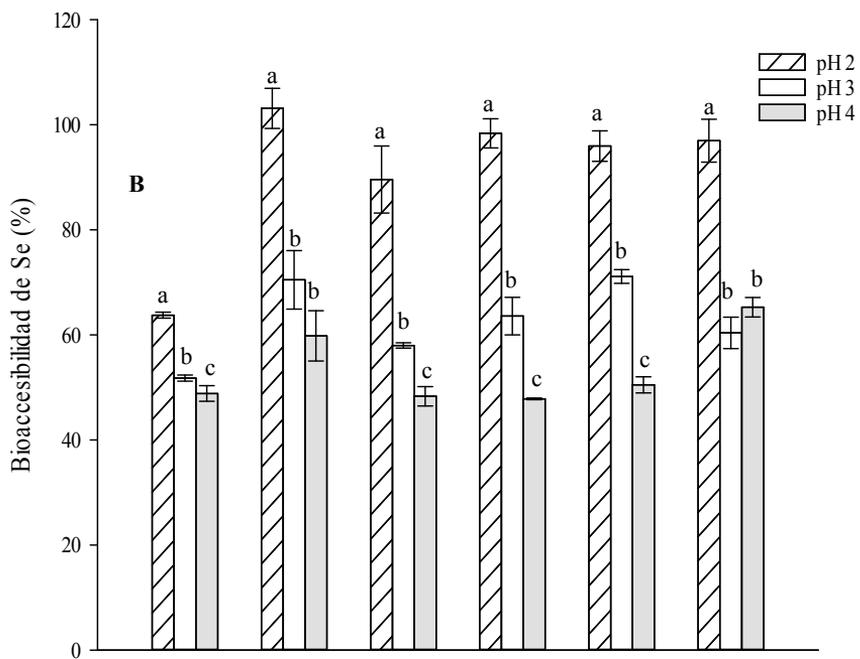


Figura 15. Continuación

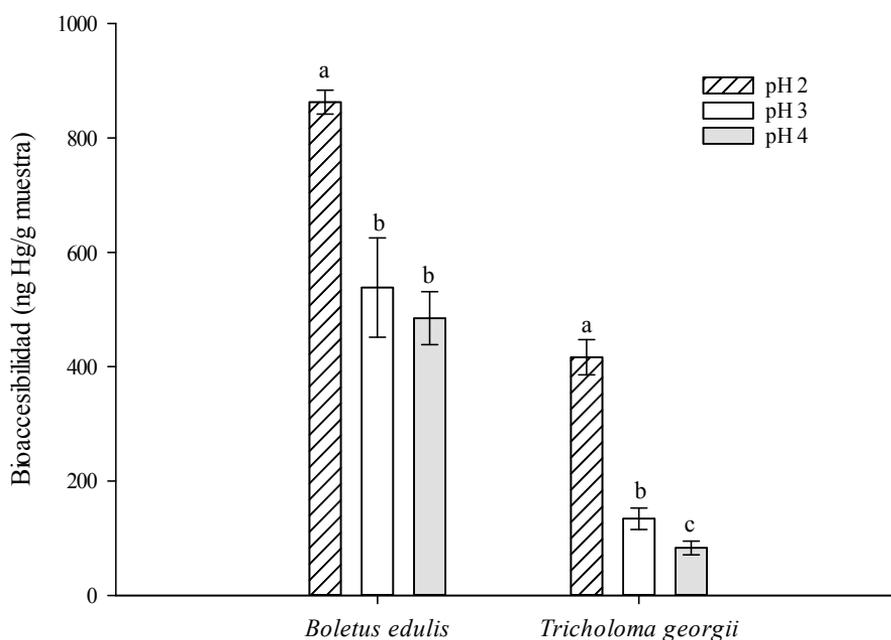


Figura 16. Influencia del pH gástrico en la bioaccesibilidad de Hg en setas. Contenidos de Hg en la fracción bioaccesible expresados en ng/g de muestra (media \pm SD, n=4). Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los contenidos bioaccesibles a distintos pH para una misma muestra.

4.2. Concentración de pepsina

La figura 17 muestra los contenidos bioaccesibles de Hg (17A) y Se (17B) obtenidos tras aplicar la digestión gástrica a muestras de pez espada en ausencia de pepsina y a distintas concentraciones de esta enzima. Para el Hg se pone de manifiesto que en ausencia de pepsina, la cantidad de Hg solubilizada es muy reducida ($< 5\%$) y que hasta concentraciones de pepsina de 0,06 g/100 g de digerido, un aumento en la concentración de pepsina supone un incremento significativo en el contenido solubilizado. Para el Se, en cambio, no se observa un

efecto tan marcado de la pepsina en la bioaccesibilidad. En ausencia de pepsina también se solubiliza menos Se (19-57%); sin embargo, el aumento de la concentración de pepsina, no aumenta la bioaccesibilidad para la mayoría de las muestras analizadas. A pH 2, las digestiones realizadas a diferentes concentraciones de pepsina presentan un ratio molar Se/Hg similar, solamente en ausencia de pepsina se obtienen valores Se/Hg distintos y mayores a la unidad en todos los casos (3-144).

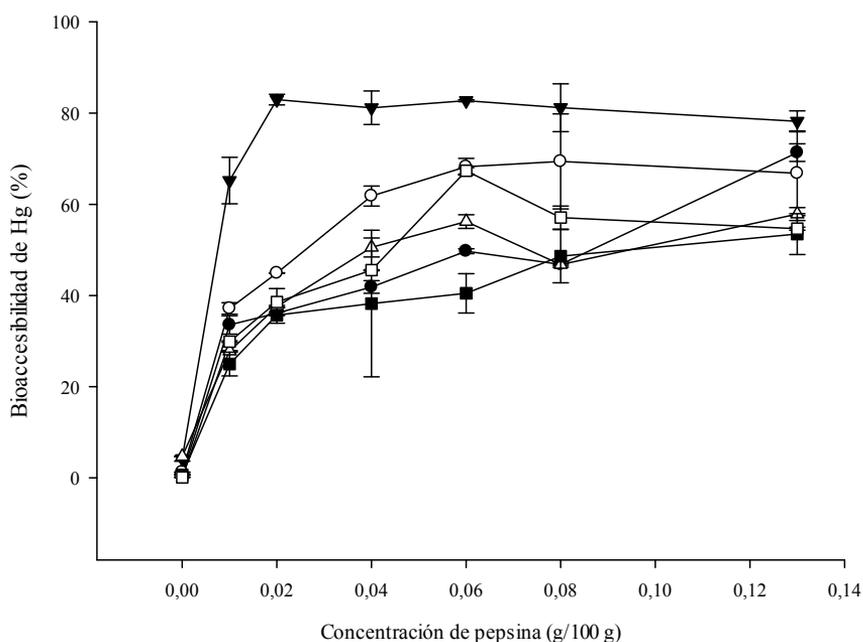


Figura 17. Influencia de la concentración de pepsina en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada. Bioaccesibilidad del Hg (17A) y Se (17B) expresada como porcentaje respecto al contenido inicial del producto (media \pm SD, n=4). Cada línea corresponde a una muestra de pez espada.

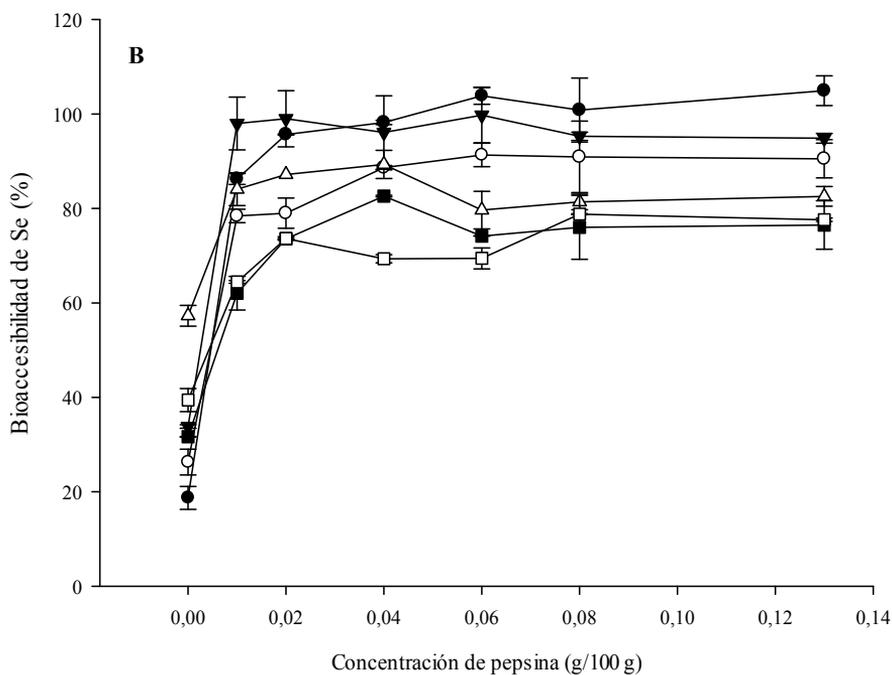


Figura 17. Continuación.

A diferencia de lo que ocurre en pez espada, la ausencia o presencia de pepsina no afecta significativamente la liberación de Hg y Se durante la digestión de setas (datos no mostrados), posiblemente porque al tratarse de una matriz con un bajo contenido proteico (< 2%), la acción de una enzima con actividad proteasa no es determinante.

4.3. Tiempo de duración de la etapa gástrica

Este ensayo se ha llevado a cabo empleando tiempos habituales de vaciado estomacal (2-6 h, Versantvoort *et al.*, 2004). Los resultados muestran nuevamente que la bioaccesibilidad de ambos elementos se modifica de manera independiente. La bioaccesibilidad de Hg puede aumentar con el tiempo de residencia gástrica (figura 18) y esto depende de la solubilización a 2 h. Así, no se observan aumentos con el tiempo para muestras con una bioaccesibilidad inicial elevada, sin embargo, los incrementos son notables (1,3-1,9 veces mayor a 6 h que a 2 h), para muestras con bioaccesibilidades a las 2 h inferiores al 65%.

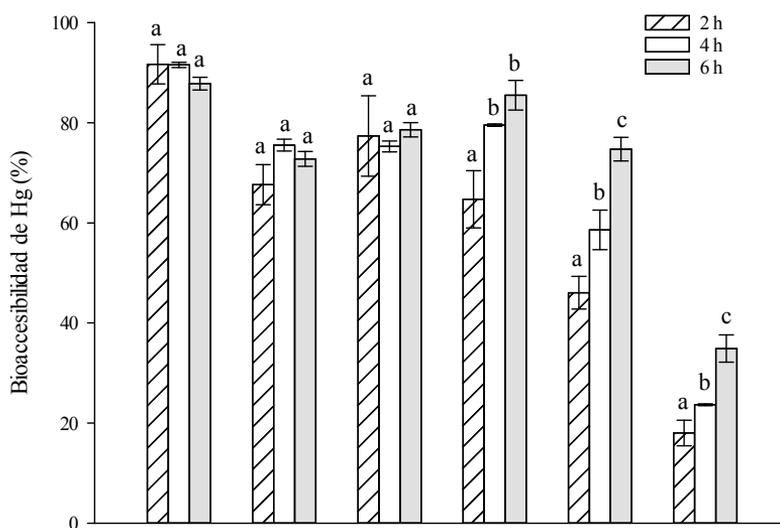


Figura 18. Influencia del tiempo de duración de la etapa gástrica en la bioaccesibilidad de Hg en pez espada. Bioaccesibilidad expresada como porcentaje respecto al contenido inicial del producto (media \pm SD, n=4). Cada grupo de barras corresponde a una muestra de pez espada. Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a los distintos tiempos para una misma muestra.

Por el contrario, el aumento del tiempo de digestión no afecta la bioaccesibilidad del Se, ya que para la mayoría de las muestras la solubilización es casi completa tras 2 h de digestión (81-99%, datos no mostrados). La bioaccesibilidad de Hg y Se en setas tampoco se modifica a tiempos superiores a 2 h (datos no mostrados).

Podemos concluir tras el estudio de los parámetros de la digestión gástrica, que el pH es el parámetro que tiene una mayor influencia sobre la bioaccesibilidad de estos elementos, especialmente del Hg. Además, en pez espada la concentración de pepsina también es un factor decisivo en la solubilización de Hg. Estos parámetros son los que más afectan el ratio molar Se/Hg y por tanto los que más influyen sobre el riesgo asociado a la ingesta del alimento. Un pH más cercano a la neutralidad y una menor concentración de pepsina suponen ratios molares Se/Hg más elevados, es decir un exceso molar de Se respecto a Hg en la fracción que va a ser absorbida.

5. INFLUENCIA DE PARÁMETROS DE LA ETAPA INTESTINAL EN LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO Y EN EL RATIO SELENIO/MERCURIO

5.1. Concentración de sales biliares

En condiciones de ayuno se han descrito concentraciones de 5 g de sales biliares/L de quimo, valor que se incrementa hasta 30 g/L para una comida estándar y hasta 60 g/L para una comida grasa (Versantvoort *et al.*, 2004). En este trabajo se ha evaluado el efecto de las sales biliares, realizando la digestión intestinal de pez espada y setas en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de sales biliares (0,3 g/L; 10 g/L; 30 g/L).

La figura 19 muestra los resultados obtenidos para Hg (19A) y Se (19B) en pez espada. La presencia de sales biliares disminuye significativamente la bioaccesibilidad de Hg en todas las muestras analizadas y el descenso es

concentración dependiente. A la mayor concentración ensayada, la disminución de la bioaccesibilidad respecto a la ausencia de sales biliares oscila entre un 25 y un 94%. En cuanto al Se, en general la presencia de sales biliares no afecta de forma destacable la bioaccesibilidad, observándose incrementos discretos en 3 de las 6 muestras analizadas. El aumento de la concentración de sales biliares supone un ratio molar Se/Hg cada vez mayor, con valores que a la concentración de 30 g de sales biliares/L oscilan entre 3 y 27.

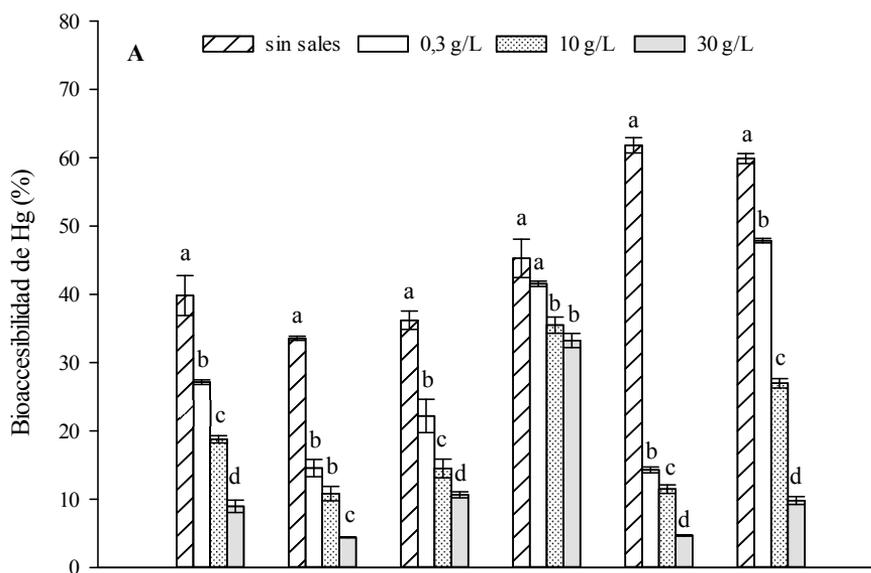


Figura 19. Influencia de la concentración de sales biliares en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada. Bioaccesibilidad del Hg (19A) y Se (19B) expresada como porcentaje respecto al contenido inicial del producto (media \pm SD, n=4). Cada grupo de barras corresponde a una muestra de pez espada. Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los contenidos bioaccesibles a las distintas concentraciones de sales biliares para una misma muestra.

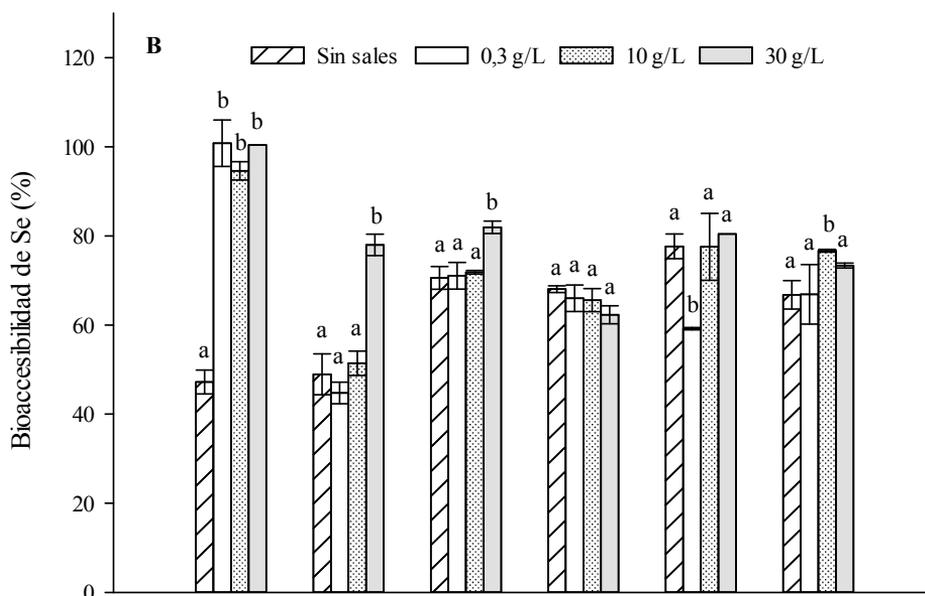


Figura 19. Continuación.

Los resultados obtenidos en setas muestran que la bioaccessibilidad de Hg y Se es independiente de la presencia o no de sales biliares en la etapa intestinal (datos no mostrados). Este hecho era de esperar si se tiene en cuenta que la función de los ácidos biliares es favorecer la digestión y absorción de los lípidos, y las setas son matrices alimentarias con un bajo contenido en grasas (< 0,5 g/100 g).

5.2. Concentración de lipasa pancreática

El estudio sobre la influencia de la lipasa pancreática en la bioaccessibilidad de Hg y Se se ha llevado a cabo empleando las concentraciones descritas en el duodeno durante la digestión de alimentos con distintos contenidos en grasa (Versantvoort *et al.*, 2004). Este ensayo únicamente se ha llevado a cabo en pez espada debido al

escaso contenido de grasa de las setas. Los resultados (figura 20) muestran que para las concentraciones más elevadas de esta enzima hay un aumento de la bioaccesibilidad, que es mayor para el Hg (12-94%, figura 20A) que para el Se (2-21%, figura 20B). Esto supone un cambio en los ratios molares Se/Hg, que se reducen al aumentar la concentración de lipasa aunque en ningún caso son inferiores a la unidad porque la cantidad de Se en la fracción bioaccesible es superior a la de Hg para todas las muestras analizadas en este ensayo.

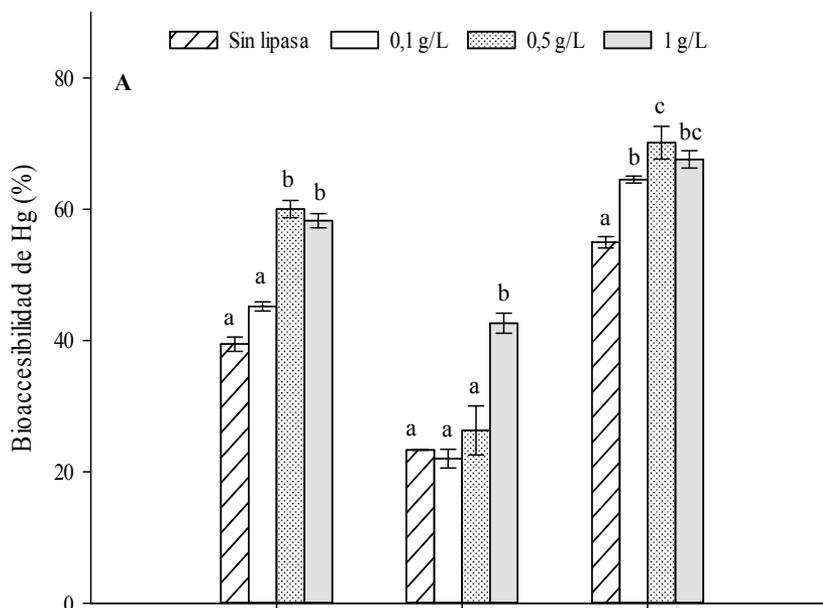


Figura 20. Influencia de la concentración de lipasa en la bioaccesibilidad de Hg y Se en pez espada. Bioaccesibilidad del Hg (20A) y Se (20B) expresada como porcentaje respecto al contenido inicial del producto (media \pm SD, n=4). Cada grupo de barras corresponde a una muestra de pez espada. Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los contenidos bioaccesibles a las distintas concentraciones de lipasa para una misma muestra.

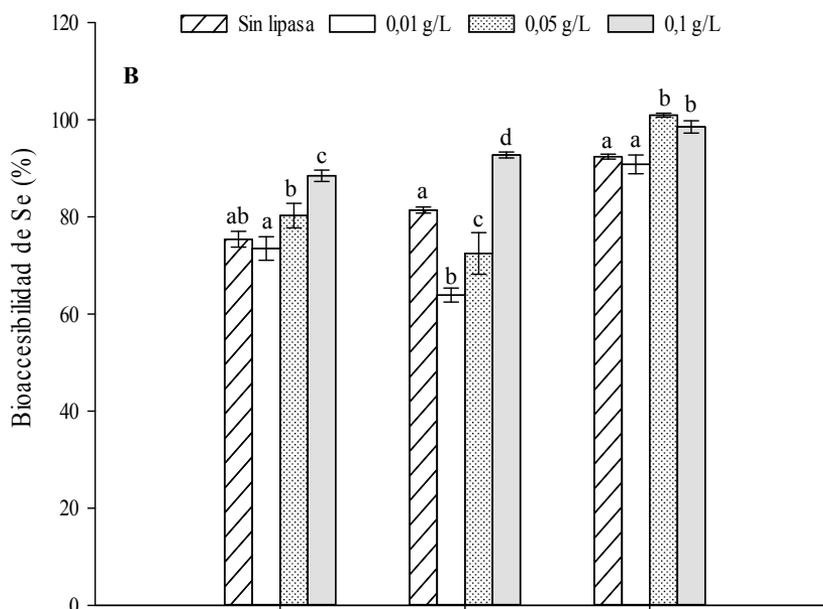


Figura 20. Continuación.

5.3. Tiempo de duración de la etapa intestinal

Se admite que el tiempo medio de tránsito intestinal es de 3 h, con un rango que oscila entre 1 y 6 h (Versantvoort *et al.*, 2004). En este capítulo se han ensayado tiempos de residencia intestinal de 2, 4 y 6 h. En pez espada se pone de manifiesto que tras 4 h de digestión intestinal se produce una disminución significativa de la bioaccesibilidad de Hg respecto a los valores hallados a 2 h (reducción: 34-41%; mediana 38%; figura 21). Tras 6 h de digestión, existe un ligero incremento de esta bioaccesibilidad hasta valores próximos a los hallados a 2 h en la mayoría de las muestras analizadas (figura 21). Para el Se, no existen variaciones destacables de la bioaccesibilidad con el tiempo de digestión intestinal (datos no mostrados). El

tiempo de duración de la etapa intestinal tampoco modifica la bioaccesibilidad de Hg y Se en setas (datos no mostrados).

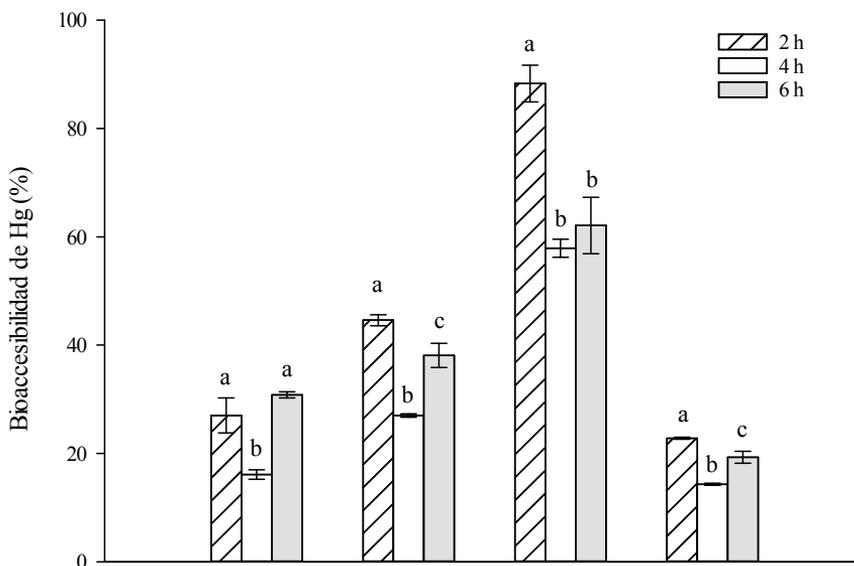


Figura 21. Influencia del tiempo de duración de la etapa intestinal en la bioaccesibilidad de Hg en pez espada. Bioaccesibilidad expresada como porcentaje respecto al contenido inicial del producto (media \pm SD, n=4). Cada grupo de barras corresponde a una muestra de pez espada. Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a los distintos tiempos para una misma muestra.

Los datos obtenidos tras las modificaciones de los parámetros de la etapa intestinal indican que su influencia sobre la bioaccesibilidad de Hg y el ratio molar Se/Hg no es tan significativa como la puesta de manifiesto cuando se modifican el pH y la concentración de pepsina de la etapa gástrica. Este hecho era de esperar teniendo en cuenta que la solubilización de ambos elementos se produce principalmente en la etapa gástrica. La bioaccesibilidad de Hg en setas y el ratio molar Se/Hg no se ven afectados por los cambios en los parámetros intestinales. En

pez espada, la bioaccesibilidad de Hg si experimenta modificaciones significativas con la concentración de sales biliares y lipasa, que tal y como se ha indicado puede deberse en parte a la naturaleza grasa de esta matriz y a las interacciones de este metal con las sales biliares.

DISCUSIÓN

El pez espada y las setas pueden llegar a acumular importantes concentraciones de Hg, lo que las convierte en matrices problemáticas en lo que a este metal se refiere. Las setas actúan como bioacumuladores del Hg presente en el suelo, con factores de bioconcentración [Hg seta/Hg suelo] que llegan a alcanzar valores de 210 (Falandysz *et al.*, 2014). Asimismo, los grandes depredadores marinos acumulan Hg a partir de concentraciones traza en agua de mar (media 1,5 pM, Gworek *et al.*, 2016), alcanzando concentraciones que comúnmente exceden 1 mg/kg ph. Diferentes organismos relacionados con la seguridad alimentaria y la salud pública han emitido recomendaciones para reducir el consumo de estos productos pesqueros en niños de corta edad (entre 1 y 30 meses), mujeres embarazadas o que puedan llegar a estarlo y mujeres en periodo de lactancia (Health Canada, 2008; AECOSAN, 2011). Por el contrario, no existen restricciones en el consumo de setas, posiblemente por tratarse de alimentos que presentan un consumo relativamente bajo, si bien en determinadas zonas del planeta se trata de un producto habitual en la dieta. Asimismo, el consumo de setas deshidratadas ha aumentado considerable en la población europea en los últimos años, destacando el consumo en países como Francia, Alemania y Países Bajos (CBI, 2016). Aunque ambos alimentos pueden considerarse importantes contribuidores de Hg a la dieta hay que tener en cuenta que son ricos en una gran variedad de nutrientes. De hecho, en el último informe de la EFSA (2012) se indica claramente que una recomendación para reducir o eliminar los productos pesqueros con elevados contenidos de Hg de la dieta no se debe hacer sin tener en cuenta que se trata de productos alimentarios con un elevado valor nutricional. Es, por tanto, necesario evaluar el riesgo/beneficio asociado a estos alimentos con mayor rigurosidad antes de emitir recomendaciones.

En el presente capítulo se ha puesto de manifiesto que el 40% de las muestras de pez espada analizadas superan tras su cocinado, el límite establecido por la legislación vigente para este pescado [1 mg/kg ph, Reglamento 420/2011]. El consumo habitual de pez espada (150 g/semana) supondría una ingesta de Hg entre 58 y 422 μg (mediana: 138 μg), que en una proporción muy alta se encuentra como CH_3Hg . La OMS establece una ingesta semanal tolerable (IST) para el CH_3Hg de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg pc/semana}$ (JECFA, 2003). Suponiendo un peso corporal medio de 65 kg para un adulto, la IST no debería exceder los 104 μg de CH_3Hg . El consumo semanal de una ración de la mayoría de las muestras analizadas en el presente estudio (67%), superaría ampliamente esta ingesta recomendada. Este problema se agrava para la población infantil cuya IST es de 48 μg , considerando un peso corporal medio de 30 Kg. En este caso, el consumo habitual de cualquiera de las muestras analizadas superaría la IST recomendada para esta franja etaria.

La situación en setas varía respecto a la descrita para pez espada. El consumo medio de setas reportadas para la población española varía entre 0,93 g/día para consumidores medios y 14,91 g/día para consumidores extremos. Para evaluar el riesgo asociado a esta ingesta debe considerarse la IST para Hg inorgánico establecida por JECFA, 3 $\mu\text{g}/\text{kg pc/semana}$ (JECFA, 2011), equivalente a una ingesta diaria de 28 μg de Hg inorgánico para un adulto de 65 kg de peso corporal. Teniendo en cuenta el rango de concentraciones de Hg encontradas en las muestras analizadas, las ingestas diarias estimadas variarían entre 0,16 a 3,2 μg (mediana: 1,5 μg) para consumidores medios y entre 2,5 a 52 μg (mediana: 24 μg) para consumidores extremos. Un 18% de los consumidores extremos superaría la IST recomendada para Hg inorgánico y un 46% presentaría ingestas cercanas a este límite (24-27 μg).

Algunos estudios sugieren que en la evaluación del riesgo asociado a la ingesta de un alimento con valores elevados de Hg, deberían tenerse en cuenta otros

nutrientes que aportan estas matrices y que podrían contrarrestar el efecto tóxico del Hg (sección 7.5 de la introducción). Este es el caso del Se, elemento traza esencial que forma parte de numerosas selenoenzimas relacionadas con el mantenimiento del balance redox (Forceville, 2006; Ralston *et al.*, 2008). Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el Se reduce la toxicidad de numerosos xenobióticos, entre ellos la derivada de la exposición a Hg. Por este motivo, algunos estudios indican que la relación molar Se/Hg 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 molares Se/Hg en plasma superiores a la unidad suponen un menor efecto tóxico del Hg (Raymond y Ralson, 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han evidenciado que el pez espada es una fuente importante de Se. El consumo de las muestras de pez espada analizadas supondría un aporte de Se entre 57 y 147 μg , cantidades que suplirían la cantidad diaria recomendada para este elemento (CDR: 55 $\mu\text{g}/\text{día}$, IOM, 2000). En cuanto a las setas deshidratadas, un consumo medio (0,93 g/día) aportaría una cantidad de Se (0,12-20,5 $\mu\text{g}/\text{día}$) que supondría un 0,2-37% de la CDR. Para consumidores extremos, la cantidad de Se aportado supondría entre 0,3 y 600%. Hay que destacar el elevado aporte de las muestras de *Boletus edulis*, superior al 432% del CDR para este elemento. Estos elevados contenidos de Se se traducen en ratios molares Se/Hg superiores en la mayoría de los casos a la unidad (80% en pez espada; 100% en setas), lo que según indican los estudios previamente mencionados, supone un menor riesgo para el consumidor. De hecho algunas de las muestras que inicialmente sobrepasaban el límite legislado y la ingesta recomendada para el Hg, presentan un exceso molar de Se en su composición.

Por otro lado, 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 finalmente a circulación sistémica y ejerce el efecto tóxico. Entre estos procesos cabe destacar la digestión gastrointestinal, que disgrega la matriz alimentaria y solubiliza el contaminante para su posterior absorción. En el presente capítulo 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 de pez espada (67%), el 50% del contenido inicial. En setas, los valores de bioaccesibilidad son todavía más bajos ($\leq 35\%$). Hay que destacar que la estructura de la pared celular de las setas está formada principalmente por quitina, cuya digestibilidad es muy reducida dado que los humanos carecen de enzimas para digerir este tipo de estructura (Manzi *et al.*, 2001; Kalač, 2009; Cheung, 2013). Se sugiere que las elevadas proporciones no digeridas de quitina pueden ser responsables de la limitación en la biodisponibilidad de otros componentes de este alimento (Kalač, 2009).

Teniendo en cuenta los contenidos solubilizados de Hg tras la digestión gastrointestinal en pez espada (0,07-1,54 $\mu\text{g/g ph}$) y el consumo de una porción habitual de este producto pesquero (150 g), los contenidos de Hg que podrían ser absorbidos tras la ingesta varían entre 11 y 231 μg (mediana: 50 μg); sólo un 20% de las muestras superaría la IST para CH_3Hg . Para las setas la situación es todavía más favorable debido a la baja bioaccesibilidad que presenta el Hg. Así con los contenidos bioaccesibles de Hg obtenidos y teniendo en cuenta el bajo consumo de este alimento (0,93-14,91 g/día), la cantidad de Hg que podría ser absorbida sería inferior a 0,6 μg en consumidores medios y 9,1 μg en consumidores extremos, valores que sólo suponen un 2-33% de la IST para Hg inorgánico. En ambas matrices, la estimación del riesgo en base al contenido bioaccesible supone una disminución respecto al riesgo estimado en base al contenido en el producto. Adicionalmente, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la

bioaccesibilidad del Se es mayor que la de Hg en un mismo producto alimentario. Esto hace que el ratio molar Se/Hg de la fracción bioaccesible sea superior a la unidad en todas las muestras analizadas. Atendiendo a estos resultados, podemos decir que podría llegar a la circulación sistémica un exceso molar de Se respecto a Hg y esto podría reducir el efecto tóxico del Hg, tal y como indican trabajos previos (Raymond y Ralston, 2006). Sin embargo, teniendo en cuenta la complejidad del proceso absorbivo, debería confirmarse este punto mediante estudios *in vivo* que evalúen la cantidad que llega al torrente circulatorio de ambos elementos tras la ingesta de estos alimentos.

Los resultados presentados hasta el momento evidencian la importancia de la bioaccesibilidad en la evaluación de la seguridad en alimentos con elevados contenidos de Hg. El hecho de que la digestión gastrointestinal sea una etapa determinante en el riesgo asociado a la ingesta de estos alimentos genera la necesidad de conocer la influencia de los distintos factores que en ella intervienen (pH gástrico, secreción de enzimas y sales biliares, etc). Estos parámetros varían durante el proceso digestivo dependiendo de la composición de la comida y las características fisiológicas del propio individuo (edad, sexo, patologías gastrointestinales o sistémicas preexistentes). En el presente capítulo se ha modificado cada uno de estos parámetros durante la digestión de pez espada y setas para determinar aquellos que pudieran tener una mayor influencia en la liberación de Hg de la matriz. Los resultados evidencian que el pH gástrico es el factor más determinante. La mayor solubilización de Hg se produce a pH 2 y a medida que aumenta el pH la bioaccesibilidad de este metal se reduce y aumenta el ratio molar Se/Hg, especialmente en pez espada. Esta modificación de la bioaccesibilidad de Hg en función del pH puede tener una connotación positiva ya que favorece a determinados grupos considerados más susceptibles al efecto tóxico del Hg. Según un estudio llevado a cabo por Nagita *et al.* (1996), el pH intragástrico en la población infantil disminuye con la edad, alcanzando los valores de la población

adulto (1,5-2) a los 14 años. El pH intragástrico en niños pequeños se mantiene por encima de 4 durante la mayor parte del día y los aumentos después de las comidas son mayores y se mantienen durante períodos más prolongados de tiempo. También se ha evidenciado un incremento del pH intragástrico durante el embarazo debido a una reducción de la secreción de H^+ (Dawes y Chowienczyk, 2001). Por tanto, los pHs intragástricos de estos grupos poblacionales estarían en el rango en el cual la liberación y solubilización de Hg desde los alimentos es menor y el ratio molar Se/Hg de la fracción disponible para la absorción mayor.

El efecto del pH gástrico es más notable en el pez espada que en las setas, hecho que podría estar relacionado con el mayor contenido proteico del producto pesquero. Antecedentes previos indican que el Hg en los productos pesqueros se encuentran mayoritariamente en la fracción proteica de los alimentos (Chunhieng *et al.*, 2004; Díaz Huerta *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2011), unido probablemente a aminoácidos azufrados. Por tanto, su solubilización desde la matriz requiere, al menos en parte, de una actividad proteasa. El pH óptimo de la actividad péptica de la pepsina gástrica oscila entre 1,5 y 2,5 (Piper y Fenton, 1965). Estudios empleando distintos tipos de proteínas ponen de manifiesto que a pH 4 se produce una disminución muy destacable del ratio de digestión proteica de la pepsina (Kratzer y Porter, 1962; Beyer *et al.*, 1976). En ese sentido es de esperar que si la actividad de la pepsina se reduce debido a un aumento del pH, se produzca una disminución de la bioaccesibilidad de Hg. De hecho, los estudios realizados en ausencia de pepsina a pH 2 en pez espada, indican claramente que la solubilización de Hg depende de su actividad, ya que se reduce de forma significativa en ausencia de esta enzima. Podemos por tanto concluir, que la pepsina es también un factor importante en la solubilización de Hg en pez espada y la variación de las concentraciones de la misma afectan su bioaccesibilidad.

Otro factor importante en la digestión gastrointestinal, especialmente en los alimentos con una importante proporción de lípidos, son las sales biliares. El intestino delgado es la parte del tracto gastrointestinal donde tiene lugar la mayor parte de la lipólisis y proteólisis, y las sales biliares secretadas con la bilis en el duodeno desempeñan un papel importante en los aspectos coloidales de ambos tipos de procesos digestivos (Maldonado-Valderrama *et al.*, 2011). El pez espada es un producto pesquero con contenidos importantes de lípidos (5-9%) y por tanto sería de esperar que la presencia de sales biliares aumentara la bioaccesibilidad de los elementos que lo componen. Esto es lo que se observa para el Se, que experimenta un aumento de hasta un 152% en presencia de contenidos biliares semejante a los presentes en intestino durante la digestión de alimentos con altos contenidos en grasa (Versantvoort *et al.*, 2004). Sin embargo, se observa el efecto contrario para el Hg, donde la presencia de sales biliares puede reducir hasta un 94% el Hg solubilizado tras la digestión. El CH₃Hg presenta afinidad por la taurina (Hoban, 2008), aminoácido que forma parte de ácidos biliares conjugados como el quenodeoxicólico, deoxicólico y cólico. Es posible que se produzca algún tipo de complejo del CH₃Hg con estos ácidos biliares. Se sabe que la solubilidad de los ácidos biliares depende del pH y de iones como el calcio (Hofmann y Mysels, 1992). En determinadas condiciones estos ácidos pueden precipitar, hecho que podría explicar la disminución de la bioaccesibilidad de Hg observada en presencia de las sales biliares.

Finalmente hay que destacar que en presencia de lipasa pancreática se favorece también la solubilización de Hg en pez espada. Se sabe que la lipasa pancreática es responsable de la mayor parte de la lipólisis que tiene lugar en el tracto gastrointestinal (Bauer *et al.*, 2005). Sus concentraciones también aumentan durante la digestión principalmente de productos grasos (Versantvoort *et al.*, 2004). Hay que destacar que esta lipasa necesita para su adecuado funcionamiento de una proteína, la colipasa, que se cree que interviene favoreciendo el contacto de la lipasa

soluble con la interfase grasa-agua (Bauer *et al.*, 2005). En nuestro estudio no se ha empleado colipasa, por tanto puede que la actividad lipasa sea más determinante de lo que aquí se muestra. Este aumento de la bioaccesibilidad de Hg con la lipasa puede ser la razón de que *in vivo* se observe un aumento de la absorción de Hg en presencia de grasas en la dieta (Højbjerg *et al.*, 1992).

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos se concluye que la estimación del riesgo asociado a la ingesta de Hg a través de los alimentos varía al considerar la bioaccesibilidad en lugar de los contenidos en el producto y al incluir el aporte de Se en la evaluación. Considerando estos parámetros se ha evidenciado que algunas de las muestras que superaban los límites legislados y cuyo consumo excedía la IST de Hg inorgánico y CH₃Hg podrían presentar un riesgo asociado menor al esperado, ya que la fracción bioaccesible de Hg es reducida y el ratio molar Se/Hg es mayor a la unidad. Por otro lado, también se pone de manifiesto el importante papel de la digestión y dentro de ella la influencia que tiene el pH intragástrico en la magnitud de la bioaccesibilidad de Hg. El hecho de que esta bioaccesibilidad se reduzca a pH mayores a 2 puede indicar que determinados grupos poblacionales, en concreto niños pequeños y mujeres embarazadas, vean reducida la entrada de este elemento tóxico al torrente sanguíneo. Son necesarios estudios *in vivo* para confirmar esta hipótesis, de gran relevancia si se tiene en cuenta que estos son los grupos más vulnerables al efecto tóxico del Hg. Por otro lado, hay de destacar que una mayor actividad lipasa durante el proceso digestivo también favorece la liberación del Hg presente en pez espada, hecho que puede apuntar a que la presencia de lípidos en la dieta favorezca la entrada de Hg a la circulación sistémica.

Destacar que, aunque haya una reducción del riesgo tras la digestión, los contenidos de Hg bioaccesibles para algunas muestras de pez espada y setas exceden los valores toxicológicos de referencia, de ahí la necesidad de reducir el aporte de Hg que estas matrices realizan. A estos alimentos hay que sumar la contribución dietaria que, en determinadas regiones de nuestro planeta y debido a una contaminación antropogénica, produce el agua de bebida. Esta problemática no se puede abordar únicamente restringiendo el consumo de estos alimentos y de agua y, por lo tanto, deberían ensayarse vías alternativas para reducir la exposición. Este va a ser el objetivo de los siguientes capítulos de la presente tesis; intentar reducir la biodisponibilidad oral de Hg mediante estrategias que reduzcan la cantidad de Hg bioaccesible o el transporte del Hg liberado durante la digestión a través de la pared gastrointestinal.

Capítulo 2

**Evaluación del efecto de componentes alimentarios
sobre la bioaccesibilidad de las formas mercuriales**

Las investigaciones encaminadas a reducir la exposición oral a Hg se han centrado principalmente en productos pesqueros, ya que son los alimentos que en mayor medida contribuyen a la ingesta de este contaminante por la población. La restricción del consumo de estos alimentos, tal y como se ha comentado previamente, no se contempla debido a su elevado valor nutricional y a que en muchos lugares son la base de la dieta. Se han planteado por ello alternativas de distinta índole para reducir el aporte de Hg a través de los productos pesqueros. En un estudio llevado a cabo en atún de aleta azul criado en cautividad se ha puesto de manifiesto que es posible reducir los niveles de Hg en este pez mediante el control de la alimentación (Nakao *et al.*, 2009). Sin embargo, esta estrategia no puede ser aplicada a productos pesqueros con elevados contenidos de Hg que no se crían en cautividad.

Varios estudios han intentado eliminar el Hg de los peces después de su captura, empleando principalmente cisteína como agente quelante. Estos ensayos han demostrado una alta eficacia (40-79%), si bien en todos los casos son necesarios largos tiempos de incubación (24 h), pHs ácidos (< 3) y muestras precocinadas o desestructuradas para obtener buenos resultados (Yannai y Saltzman, 1973; Schab *et al.*, 1978; Aizpurúa *et al.*, 1997). Sin embargo, esta reducción no se consigue con filetes enteros, tiempos cortos y pH neutros, que son los parámetros que interesan para que no exista deterioro de la matriz alimentaria y que el producto final tenga aceptabilidad entre los consumidores. Otras estrategias emplean quelantes como el EDTA (Hajeb y Jinap, 2012), cuyo uso en alimentos está contemplado (E385) por la Unión Europea (Reglamento 1129/2011) aunque su consumo en niños y mujeres embarazadas no está recomendado y en países como Australia está prohibido su uso como aditivo alimentario. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con otros elementos traza tóxicos, el cocinado no supone una reducción del Hg presente en productos pesqueros, pudiendo llegar incluso a conllevar un aumento por concentración debido a la pérdida de agua y otros componentes solubles (sección 5

de la introducción). Por lo tanto, actualmente no se pueden emitir recomendaciones para reducir la exposición a Hg tras la preparación doméstica del producto.

Todos los estudios mencionados evidencian la dificultad de eliminar o reducir el Hg del producto pesquero antes de su consumo. El objetivo de este capítulo ha sido la búsqueda de componentes alimentarios capaces de reducir la cantidad de Hg bioaccesible tras la digestión gastrointestinal de agua y alimentos, con el fin de encontrar alternativas para reducir la exposición a Hg. Una reducción de la bioaccesibilidad supone una reducción de la cantidad del tóxico que puede absorberse y llegar a la circulación sistémica, y por tanto una reducción de la exposición interna al tóxico. El empleo de componentes alimentarios busca que estas estrategias no supongan un riesgo para el consumidor.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA SOLUBILIDAD DE MERCURIO EN DISOLUCIONES PATRÓN

La mayoría de los componentes alimentarios empleados en este estudio se han seleccionado en base a estudios previos donde se evidencia su eficacia uniendo cationes y/o reduciendo la solubilidad de los mismos. Otros se han empleado por presentar similitud estructural con compuestos que tenían una eficacia probada.

Tras 30 min de contacto de los componentes alimentarios con las disoluciones patrón de Hg(II) y CH₃Hg se observan reducciones estadísticamente significativas de la solubilidad del Hg (tabla 15). De los 28 compuestos ensayados, 13 reducen la solubilidad de Hg(II) de forma significativa (goma arábica, carboximetilcelulosa CMC, hidroxipropilcelulosa HPC, hidroxipropilmetilcelulosa HPMC, lignina, ácido lipoico, ácido málico, xilano, metilcelulosa MC, N-acetil-L-cisteína NAC, pectina, saponina y ácido tánico) y 10 disminuyen la del CH₃Hg [goma arábica, quitosano, Fe(III), goma guar, lignina, MC, pectina, saponina, ácido tánico y xilano]. Las reducciones de mayor magnitud se ponen de manifiesto para el Hg(II), donde la solubilidad disminuye más de un 44% con pectina, CMC, HPMC y ácido lipoico. Reducciones tan elevadas sólo se evidencian para el CH₃Hg en presencia de ácido tánico y quitosano de densidad media.

Aunque no todos los componentes son eficaces en la reducción de la solubilidad de Hg, todos han sido evaluados en los ensayos posteriores de bioaccesibilidad (sección 2 del presente capítulo). Esta decisión se tomó teniendo en cuenta que las condiciones de digestión gastrointestinal son diferentes y que los tiempos de contacto son superiores a los empleados en este primer ensayo.

Componente alimentario	Reducción solubilidad de Hg(II) (%)	Reducción solubilidad de CH ₃ Hg (%)
Ácido cítrico	3,9 ± 2,9	—
Ácido fítico	7,4 ± 3,2	1,2 ± 0,7
Ácido lipoico	45,8 ± 5,2**	10,7 ± 4,0
Ácido málico	15,0 ± 2,5**	4,1 ± 1,1
Ácido oxálico	6,4 ± 1,0	—
Ácido tánico	20,8 ± 2,1**	49,0 ± 1,1**
Alginato sódico	5,3 ± 0,8	—
Ca/Ácido fítico	—	—
Carboximetilcelulosa (CMC)	67,2 ± 1,6**	6,5 ± 1,7
Catequinas	—	5,1 ± 3,4
Cisteína	—	2,3 ± 2,4
Fe(III)	—	14,0 ± 3,1**
Gelatina	—	—
Goma arábica	14,7 ± 5,9*	12,1 ± 2,0*
Goma guar	—	16,5 ± 9,2*
Goma xantana	4,9 ± 1,3	—
Hidroxipropilcelulosa (HPC)	25,9 ± 5,1**	13,2 ± 3,8
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	45,7 ± 7,1**	9,6 ± 4,2
Lignina	21,9 ± 5,5*	28,3 ± 3,9**
Metilcelulosa (MC)	14,7 ± 4,6**	26,1 ± 1,8**
N-acetil-L-cisteína (NAC)	11,9 ± 2,2*	—
Pectina	43,5 ± 6,2**	27,5 ± 2,7**

Tabla 15. Efecto de los componentes alimentarios sobre la solubilidad del Hg. Porcentajes de reducción de la solubilidad de Hg en disoluciones acuosas de Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) tras 30 min de contacto con los componentes alimentarios. Valores expresados como media ± SD (n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la solubilidad del Hg en disolución sin la adición de los componentes alimentarios [**, p < 0,001; *, 0,001 < p < 0,05].

Componente alimentario	Reducción solubilidad de Hg(II) (%)	Reducción solubilidad de CH ₃ Hg (%)
Quitosano (densidad media)	—	46,7 ± 12**
Saponina	26,9 ± 4,6**	13,4 ± 4,5**
Se(VI)	—	—
Seleno-DL-metionina (SeMet)	—	—
Xilano	16,5 ± 2,8*	10,5 ± 2,7**
λ carragenato	—	4,7 ± 2,6

Tabla 15. Continuación.

2. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO DESDE DISOLUCIONES ACUOSAS

Tras el contacto con los componentes, las mezclas componente alimentario/especie mercurial se sometieron a las condiciones de la digestión gastrointestinal. Las figuras 22 y 23 muestran respectivamente el porcentaje de reducción de la cantidad de Hg(II) y CH₃Hg soluble tras la aplicación del proceso digestivo en presencia de los compuestos. La mayoría de los componentes alimentarios reducen la bioaccesibilidad de ambas formas mercuriales de forma significativa, observándose cambios mayores que los obtenidos en el contacto inicial de 30 min. Son destacables las reducciones producidas para el Hg(II) por la HPMC (70 ± 3%), CMC (67 ± 6%), pectina (65 ± 2%), lignina (62 ± 2%), MC (48 ± 4%), goma arábiga (46 ± 2%), ácido tánico (43 ± 5%) y quitosano (38 ± 4%). Al igual que ocurría durante los 30 min en contacto, la bioaccesibilidad de CH₃Hg se reduce en menor magnitud que la de Hg(II), siendo destacable la reducción en presencia de ácido tánico (48 ± 4%), HPMC (40 ± 4%), pectina (39 ± 3%) y MC (33 ± 7%).

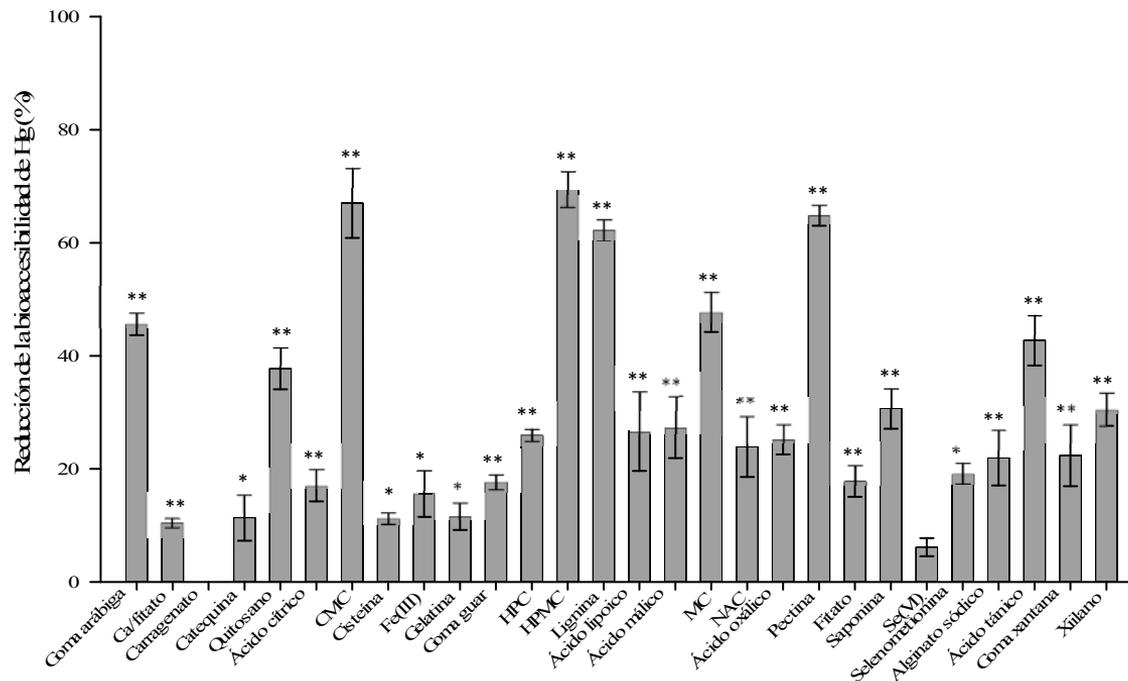


Figura 22. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de Hg(II). Porcentaje de reducción de la solubilidad de Hg en una disolución acuosa de Hg(II) (1 mg/L) tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión de la disolución acuosa sin adición del componente alimentario [******, $p < 0,001$; *****, $0,001 < p < 0,05$].

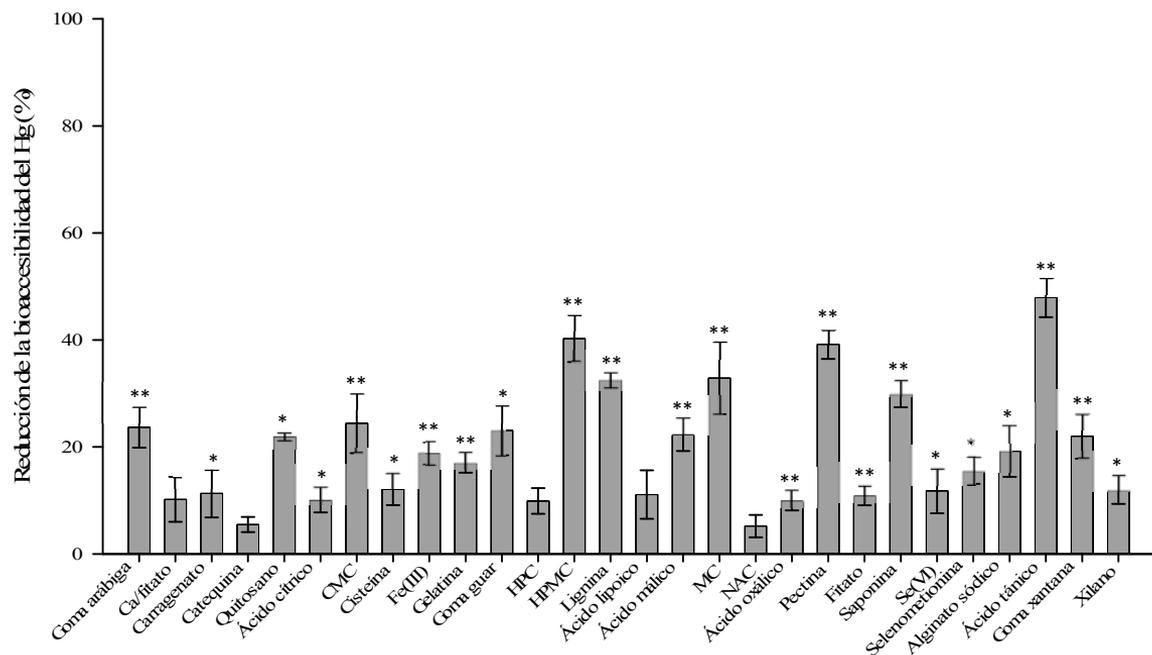


Figura 23. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de CH_3Hg . Porcentaje de reducción de la solubilidad de Hg en una disolución acuosa de CH_3Hg (1 mg/L) tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión de la disolución acuosa sin adición del componente alimentario [******, $p < 0,001$; *****, $0,001 < p < 0,05$].

Los resultados obtenidos en patrones han permitido seleccionar los compuestos a ensayar en muestras de alimentos (tabla 7 de metodología). Se han elegido aquellos compuestos capaces de reducir al menos un 25% la solubilidad de alguna de las especies mercuriales [goma arábica, quitosano, CMC, HPC, HPMC, lignina, ácido lipoico, MC, pectina, saponina, ácido tánico y xilano].

3. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO DESDE ALIMENTOS

Las figuras 24 y 25 muestran los contenidos bioaccesibles de Hg de muestras de pez espada y atún respectivamente, tras la aplicación de la digestión gastrointestinal en presencia y ausencia de los componentes alimentarios. La mayoría de los componentes producen una reducción significativa de la bioaccesibilidad del Hg, excepto la goma arábica, la saponina y el ácido lipoico para el pez espada, y la goma arábica y la saponina para el atún. En general, el aumento de la concentración del componente conlleva un aumento de la reducción en la bioaccesibilidad del Hg. Dentro de los componentes que reducen la bioaccesibilidad de forma más notable hay que destacar el ácido tánico (pez espada: 68 y 84%; atún: 59 y 78%), la lignina (pez espada: 68 y 82%; atún: 65 y 95%), la pectina (pez espada: 55 y 72%; atún: 30 y 66%), la MC (pez espada: 53 y 48%; atún: 39 y 54%), la CMC (pez espada: 47 y 62%; atún: 19 y 43%) y la HPMC (pez espada: 33 y 58%; atún: 34 y 74%).

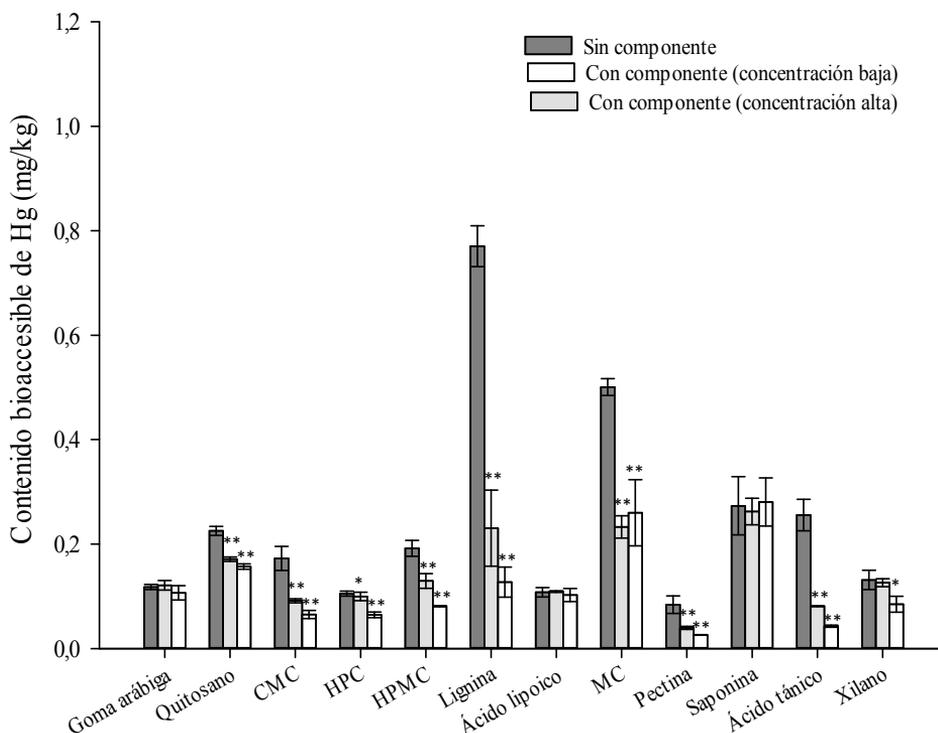


Figura 24. Efecto de los componentes dietarios en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de pez espada. Valores expresados en mg/kg producto pesquero (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de la bioaccesibilidad de Hg en presencia del componente frente a la bioaccesibilidad de Hg sin adición del mismo (**, $p < 0,001$; *, $0,001 < p < 0,05$).

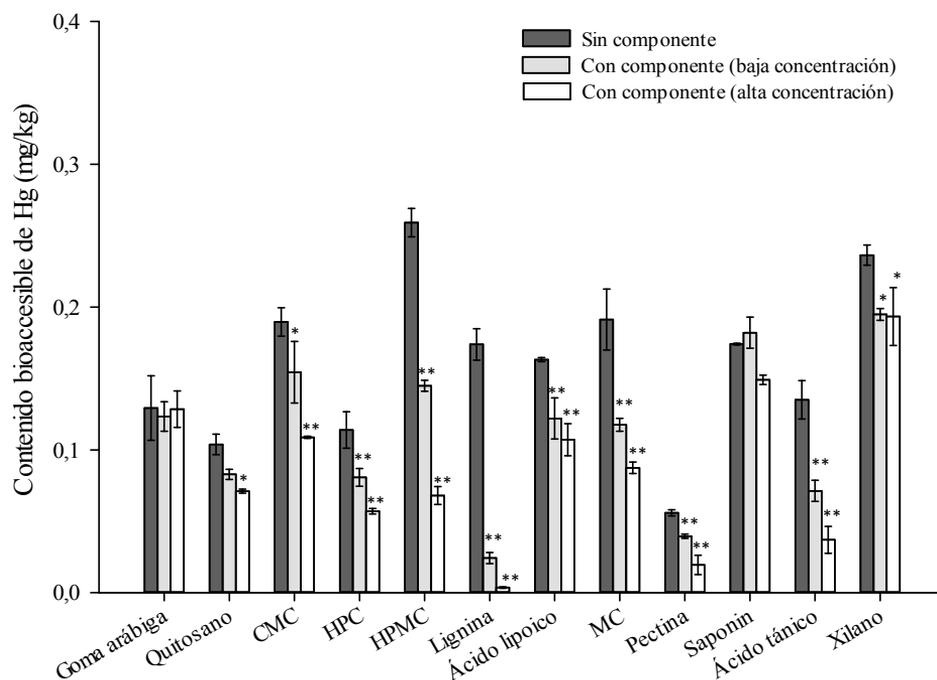


Figura 25. Efecto de los componentes dietarios en la bioaccessibilidad de Hg en muestras de atún. Valores expresados en mg/kg producto pesquero (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de la bioaccessibilidad de Hg en presencia del componente frente a la bioaccessibilidad de Hg sin adición del mismo (**, $p < 0,001$; *, $0,001 < p < 0,05$).

El efecto de los componentes alimentarios en la bioaccessibilidad del Hg presente en setas (figura 26) no es tan acentuado como el obtenido para productos pesqueros. Los descensos más significativos se ponen de manifiesto en presencia de ácido tánico (85 y 91%), HPMC (29 y 48%) y HPC (13 y 40%). Al igual que ocurre para productos pesqueros, un aumento de la concentración del componente alimentario conlleva una mayor reducción de la bioaccessibilidad del Hg.

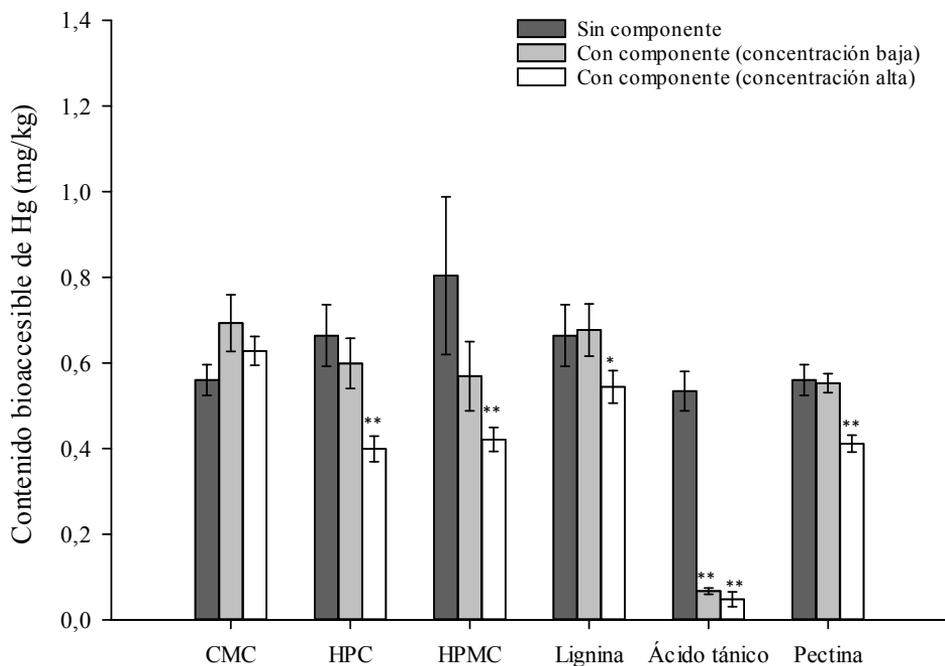


Figura 26. Efecto de los componentes dietarios en la bioaccesibilidad de Hg en muestras de setas. Valores expresados en mg/kg de seta (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias significativas de la bioaccesibilidad de Hg en presencia del componente frente a la bioaccesibilidad de Hg sin adición del mismo (**, $p < 0,001$; *, $0,001 < p < 0,05$).

4. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE ELEMENTOS ESENCIALES Y LAS FORMAS QUÍMICAS DE MERCURIO

Para aquellos componentes alimentarios más eficaces reduciendo la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos se ha estudiado el efecto de su adición sobre la bioaccesibilidad de otros elementos esenciales, con el fin de buscar estrategias dietarias que no conlleven efectos negativos sobre la salud en el caso de plantearse su uso en intervenciones poblacionales. Adicionalmente se han llevado a cabo

ensayos de especiación con el fin de evaluar si la presencia de estos componentes puede ocasionar transformaciones de las formas mercuriales presentes en la fracción bioaccesibles y de existir, si esto supone cambios relevantes en la toxicidad de estas fracciones.

En tabla 16 se muestra el efecto de estos componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de pez espada, atún y setas. Con excepción del Fe, los componentes ensayados no reducen de forma importante los contenidos de estos minerales en la fracción soluble obtenida tras la digestión gastrointestinal de productos pesqueros. Las mayores reducciones en la bioaccesibilidad del Fe del pez espada se producen por la adición de tánico, lignina y la MC, y en el atún por la lignina y pectina. En setas, la situación es diferente, y la presencia de componentes alimentarios en la digestión gastrointestinal supone una reducción importante de la mayoría de elementos mayoritarios estudiados, siendo la HPMC el compuesto que tiene mayor efecto.

En algunos casos se observan importantes incrementos de los contenidos bioaccesibles de estos elementos que pueden ser consecuencia de su presencia en el componente adicionado.

	Compuesto alimentario	Ca	Mg	K	Fe	P
Pez espada	Ácido tánico	-25%	-21%	-61%	-100%	-2%
	Pectina	683%	112%	8%	929%	-3%
	Lignina	-8%	24%	40%	-32%	51%
	MC	1498%	85%	9%	-51%	-2%
	CMC	139%	39%	-1%	9%	5%
	HPC	-16%	-2%	-8%	-6%	-1%
	HPMC	34%	-7%	-1%	-18%	-1%
Atún de aleta amarilla	Ácido tánico	258%	-3%	5%	-13%	4%
	Pectina	-89%	-13%	-16%	-91%	-2%
	Lignina	-4 %	-18%	0.5%	-59%	2%
	MC	10%	33%	78%	-11%	71%
	CMC	249%	29%	-10%	-14%	-5%
	HPC	5%	16%	12%	14%	51%
	HPMC	-14%	26%	9%	25%	15%
Setas	Ácido tánico	-22%	-49%	-10%	-93%	-15%
	HPMC	-93%	-92%	-92%	-67%	-89%
	HPC	-24%	-37%	-64%	11%	-30%
	Pectina	24%	-45%	-92%	2049%	-68%

Tabla 16. Modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de alimentos tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como porcentajes respecto a las digestiones realizadas sin componentes (media, n=2). Los valores negativos indican reducciones en presencia de estos componentes y los números positivos indican aumentos. En negrita se muestran las reducciones más relevantes.

Respecto a los datos sobre las especies de mercurio existentes en la fracción bioaccesible de productos pesqueros y setas cuando se incorporan los compuestos alimentarios en la digestión, se pone de manifiesto que las estrategias ensayadas no introducen cambios en la especiación. El CH_3Hg es la única especie detectable en pez espada y Hg(II) la única presente en setas (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Estudios llevados a cabo *in vitro* muestran que la bioaccesibilidad del Hg se reduce considerablemente cuando el producto pesquero es sometido a un proceso culinario (6-49%, Torres-Escribano *et al.*, 2011) y cuando la digestión gastrointestinal se lleva a cabo en presencia de otros alimentos o componentes alimentarios. Ouédraogo y Amyot (2011) muestran una reducción de la bioaccesibilidad del Hg presente en pescados (50-60%) en presencia de café, té verde y té negro. Varios estudios apuntan a que esta reducción podría deberse a la presencia en estas bebidas de polifenoles y fibra dietaria que pueden actuar como quelantes del metal (Shim *et al.*, 2009; He y Wang, 2011; Ouédraogo y Amyot, 2011).

Los estudios anteriormente mencionados sugieren que algunos componentes de la dieta podrían reducir la entrada de Hg a la circulación sistémica actuando durante el proceso digestivo mediante la formación de complejos de solubilidad reducida con el metal, lo que supondría una disminución de su absorción. Teniendo en cuenta este supuesto, en el presente capítulo se han buscado compuestos presentes en los alimentos que pudieran afectar la bioaccesibilidad del Hg con el fin de emplearlos como estrategias para la reducción del paso del Hg ingerido a la circulación sistémica. Los componentes se han seleccionado en base a su uso como quelantes de Hg o de otros cationes en muestras principalmente de aguas contaminadas y siempre teniendo en cuenta que se tratase de compuestos de origen alimentario o cuya aplicación en la industria alimentaria estuviese permitida. Asimismo, se han utilizado a concentraciones dentro de los rangos habituales en los alimentos o en la dieta.

Los resultados obtenidos indican que la mayoría de los compuestos ensayados pueden reducir la fracción soluble de Hg(II) y CH₃Hg en disolución acuosa y muchos de ellos reducen la fracción de Hg que se solubiliza tras la digestión de los productos pesqueros y setas. Podrían catalogarse como buenos candidatos para el

diseño de estrategias encaminadas a reducir la biodisponibilidad oral de Hg. 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 de la pectina, el ácido tánico, la lignina y algún derivado de celulosa. Los compuestos eficaces son moléculas complejas que forman parte de la fibra dietaria, resistentes a la digestión gastrointestinal y, exceptuando la pectina, no fermentables por la microbiota intestinal. Todas estas características facilitarían que, tras la formación del complejo con el Hg, éste no se degradara fácilmente a su paso por el tracto intestinal.

Las pectinas están formadas fundamentalmente por largas cadenas de ácido galacturónico, que puede encontrarse con el grupo carboxilo libre, o bien con el carboxilo esterificado por metanol (metoxilado). Los grupos carboxilo libres de este polisacárido son capaces de unir fuertemente cationes metálicos polivalentes (Dronnet *et al.*, 1996; Kartel *et al.*, 1999). Se ha demostrado su eficacia en la reducción de la acumulación tisular de Pb tras una exposición oral en animales de experimentación (Serguschenko *et al.*, 2007). Las pectinas no amidadas y sus sales son componentes de nuestra dieta, presentes en numerosos frutos. Además, estas formas de pectina están autorizadas en la industria alimentaria como agentes gelificantes, espesantes, estabilizadores y emulsionantes (Reglamento 1129/2011). Un estudio de exposición crónica en ratas durante 2 años a pectinas amidadas y no amidadas mostró que la presencia de pectina a una concentración del 10% en la dieta no tenía efectos adversos (JECFA, 1979). Por otro lado, el efecto potencialmente perjudicial de la disminución de la absorción de minerales en dietas altas en fibra no se ha reportado con el consumo de pectina (Behall y Reiser, 2009). Incluso se ha demostrado que este heteropolisacárido puede tener efectos beneficiosos ya que disminuye el colesterol y los niveles de glucosa en sangre (Brouns *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2015).

Al igual que la pectina, el ácido tánico tiene un elevado número de grupos carboxilo, potenciales sitios de unión para cationes. Cruz *et al.* (2000) han evidenciado la formación de complejos del ácido tánico con Zn, Pb y Cu, todos ellos cationes divalentes como el Hg inorgánico. Winiarska-Mieczan *et al.* (2013) han demostrado también la eficacia de este ácido como quelante de metales *in vivo*. La co-administración de una disolución de ácido tánico (2%) con Pb o Cd reduce la acumulación de estos elementos traza tóxicos en ratas. Este compuesto se encuentra de forma natural, junto con otros taninos condensados, en bebidas y hortalizas (Gülçin *et al.*, 2010) y también se utiliza como aromatizante de alimentos (Reglamento 872/2012) y como agente clarificante en algunas bebidas (Health Canada, 2015). Por otro lado, se considera que el ácido tánico es un compuesto con una elevada actividad antioxidante dada su capacidad de secuestrar radicales libres (Andrade *et al.*, 2005; Gülçin *et al.*, 2010). Por tanto, su empleo como estrategia dietaria para la reducción de la absorción de Hg puede tener efectos beneficiosos paralelos, especialmente si se tiene en cuenta que la generación de estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos de toxicidad de este elemento (sección 7.4 de la introducción).

La lignina ha sido, junto al tánico, el componente que ha mostrado mayor eficacia reduciendo la bioaccesibilidad de Hg en productos pesqueros. Se presenta en productos de origen vegetal tales como el trigo, los vegetales de raíz (zanahoria y 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, Cu, Cd, Zn y Ni (Crist *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2008). Según Guo *et al.* (2008), los iones metálicos presentan una elevada afinidad por los grupos fenólicos de este compuesto. De hecho, la lignina se ha propuesto como un absorbente de bajo coste para eliminar los metales de suelos y aguas contaminadas, incluso se han aplicado derivados de lignina con éxito para el tratamiento de aguas contaminadas con Hg (Zhuang *et al.*, 2003). Por tratarse de una fibra dietaria su consumo frecuente está

cuestionado ya que podría afectar la absorción de minerales. En el presente estudio se ha puesto de manifiesto una reducción de la bioaccesibilidad de Fe en las fracciones bioaccesibles de pez espada cuando se emplea lignina. Si la aplicación de este compuesto prospera como una estrategia para disminuir la biodisponibilidad de Hg, deberá comprobarse en animales de laboratorio que su aplicación no conlleva efectos no deseables en el estado nutricional.

Finalmente hay que hacer mención a la eficacia de la mayoría de los derivados de celulosa en la reducción del Hg bioaccesible. Franco *et al.* (2007) ponen de manifiesto la capacidad de la CMC como adsorbente de cationes (Al^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{6+} y V^{2+}), que según los autores se debe a grupos hidroxilo y carboxilo en la unidad de azúcar monomérico CMC-C-6. 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. Estos derivados han sido estudiados con el fin de determinar su toxicidad antes de ser reconocidos como sustancias GRAS (Generally recognized as safe). Un estudio llevado a cabo en ratas expuestas durante 2 años a MC y HPMC en la dieta (0,1- 5%) puso de manifiesto que no existían efectos adversos en términos de mortalidad, pérdida de peso corporal, parámetros hematológicos, niveles de componentes séricos, patología macroscópica y microscópica o incidencia de tumores (McCollister *et al.*, 1973). Además, se ha comprobado que algunos de estos derivados tienen efectos beneficiosos. Maki *et al.* (1999) administraron hasta 7,5 g diarios de HPMC para reducir el colesterol en pacientes con hipercolesterolemia leve a moderada. El estudio evidenció que la HPMC era eficaz en la reducción del colesterol LDL y que no había efectos adversos después de 8 semanas de administración.

Los datos mostrados en los distintos estudios evidencian que todos los compuestos que se han mostrado eficaces reduciendo la bioaccesibilidad de Hg no presentan efectos adversos a las concentraciones ensayadas. El efecto observado *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de determinados cationes esenciales puede que no

suponga un problema sobre el estado nutricional general del animal o individuo expuesto, ya que sólo se han descrito efectos sobre la absorción de minerales *in vivo* para la lignina.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente capítulo 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, podrían ser soluciones para reducir la biodisponibilidad oral de Hg. Además, serían también estrategias adecuadas para la reducción de la exposición a Hg a través del agua de bebida. Es necesario evaluar si este efecto observado *in vitro*, se confirma *in vivo*, ya que la interacción observada durante la digestión puede verse afectada por otros componentes presentes en el lumen, especialmente por la acción de la microbiota intestinal.

Estos compuestos no deberían ser perjudiciales para el consumidor, pues a las concentraciones empleadas en el presente estudio forman parte de una dieta habitual. Se ha puesto de manifiesto sin embargo, una reducción de la cantidad de cationes bioaccesibles tras algunos tratamientos. Por tanto, antes de plantearse su uso como estrategias dietarias para la reducción de la biodisponibilidad de Hg, es necesario constatar mediante ensayos en animales de laboratorio que su aplicación no reduce la concentración corporal de estos elementos, afectado al estado nutricional. La confirmación de su eficacia como reductores de la biodisponibilidad es uno de los objetivos del capítulo 5 de la presente tesis.

Capítulo 3

Evaluación del efecto de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad de las formas mercuriales

En el capítulo 3 se ha continuado la búsqueda de estrategias dietéticas que pudieran reducir la bioaccesibilidad de Hg, evaluando en este caso la eficacia de la adición de cepas de bacterias lácticas y de *Saccharomyces cerevisiae* de uso alimentario. Se trata en ambos casos de microorganismos con status GRAS, que en condiciones normales pueden ser introducidos en la dieta sin que representen un riesgo para el consumidor (JECFA, 2001).

Una de las principales aplicaciones de las bacterias lácticas es su uso en la fermentación de productos lácteos y en la producción de vinos y cervezas. En los últimos años, también se están empleando como suplementos dietéticos y en la fabricación de alimentos funcionales. La mayor parte de microorganismos catalogados como probióticos (microorganismos vivos que se introduce en la dieta y que tras ser ingeridos en cantidad suficiente, ejercen un efecto beneficioso en la salud) son bacteria ácido-lácticas, especialmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ljungh y Wadström, 2006).

Las levaduras del género *Saccharomyces*, especialmente *S. cerevisiae*, también han sido empleadas desde la antigüedad en numerosos procesos fermentativos dentro de la industria alimentaria. Recientemente, ciertas cepas de *S. cerevisiae* están siendo usadas como suplementos alimenticios debido a su alto contenido en vitaminas, minerales y proteínas (Ferreira *et al.*, 2010) y como agentes probióticos en el tratamiento de diarreas crónicas, recurrentes o agudas (Czerucka *et al.*, 2007; McFarland, 2010).

Estudios previos han puesto de manifiesto que ciertas cepas de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* tienen capacidad de unir cationes metálicos tóxicos (Monachese *et al.*, 2012), si bien esta interacción no se ha evidenciado en las condiciones en las que se produce la digestión gastrointestinal ni en presencia de alimentos. Además, se ha comprobado que estos microorganismos no sólo no afectan la biodisponibilidad de elementos esenciales, uno de los principales problemas

observados en el capítulo 2 con los componentes alimentarios, si no que pueden llegar a favorecerla (Pérez-Conesa *et al.*, 2006; Hoppe *et al.*, 2015). Por otro lado, la adición de bacterias lácticas o *Saccharomyces* puede suponer un beneficio adicional al incorporar elementos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (LeBlanc *et al.*, 2008; Fakruddin *et al.*, 2017) que podrían contrarrestar los efectos derivados de una exposición oral a las especies mercuriales.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS SOBRE LA CAPACIDAD DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DE UNIR ESPECIES MERCURIALES

Tal y como se ha comentado en la metodología (apartado 8.2), en un estudio colaborativo previo realizado entre el laboratorio donde he llevado a cabo mi tesis doctoral y el grupo de Bacterias Lácticas y Probióticos del IATA-CSIC se constató que las cepas de bacterias lácticas (viables y no viables) eran capaces de unir Hg(II) y CH₃Hg en disolución acuosa y que la acumulación alcanzaba un máximo tras 5 min de incubación a 37 °C (Alcántara *et al.*, 2017). No existen, sin embargo, antecedentes para *S. cerevisiae*, por lo que se desconocía su capacidad de unión a especies de Hg. Por ello, empleando la cepa BY4741, se ha evaluado si esta levadura podría ser candidata a ser utilizada como agente reductor de la bioaccesibilidad de Hg.

Inicialmente, el efecto de *S. cerevisiae* sobre la captación/adsorción de las distintas especies de Hg se evaluó a 30 °C, temperatura óptima de crecimiento de la levadura. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la levadura es capaz de acumular un $59 \pm 2\%$ del Hg(II) y un $76 \pm 4\%$ del CH₃Hg adicionado (figura 27). No obstante, considerando que el objetivo del trabajo es evaluar el efecto de las cepas de *S. cerevisiae* durante la digestión y absorción gastrointestinal y que estos procesos tienen lugar a 37 °C, se consideró conveniente conocer si el cambio de temperatura afectaba a esta captación.

Los resultados obtenidos a 37 °C (figura 27) evidencian que el incremento de temperatura no reduce la eficiencia del proceso de retención de Hg, sino que supone un aumento significativo de la cantidad de Hg retenido por las levaduras [Hg(II): $73 \pm 3\%$; CH₃Hg: $82 \pm 2\%$].

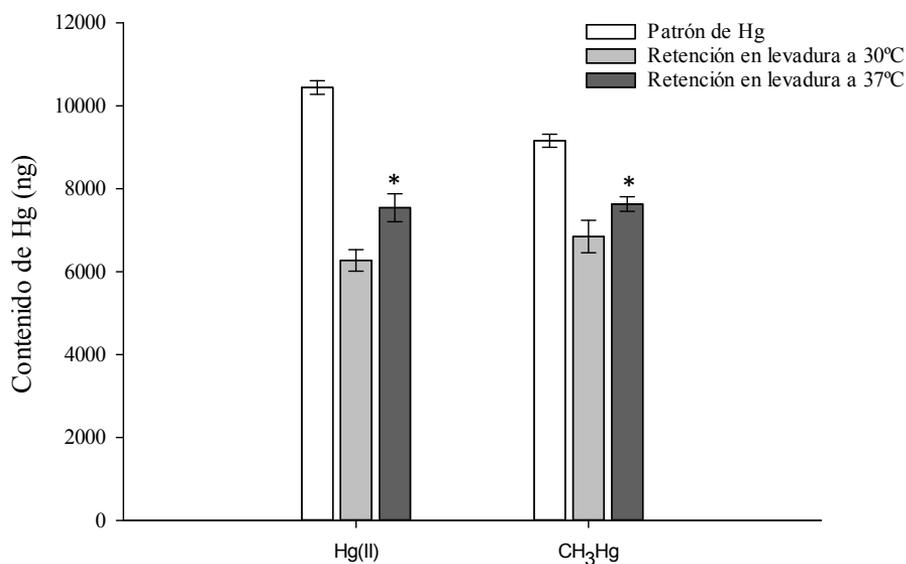


Figura 27. Efecto de la temperatura de incubación sobre la retención de Hg(II) y CH₃Hg por *S. cerevisiae* BY4741. Valores expresados como ng de Hg (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de la retención a 37 °C respecto a 30 °C.

Adicionalmente se estudió el efecto del pH (2-6) con el fin de determinar la capacidad de captación de *S. cerevisiae* en el rango de pHs del proceso digestivo. Los datos obtenidos (figura 28) muestran que no existen variaciones significativas en la captación de Hg(II) en el rango estudiado. Para CH₃Hg se observa una reducción estadísticamente significativa a medida que aumenta el pH, reducción que a pH 6 supone un 15% sobre la retención existente a pH 2. Por tanto, podemos decir que el pH no es un factor importante en la captación de Hg por parte de *S. cerevisiae*.

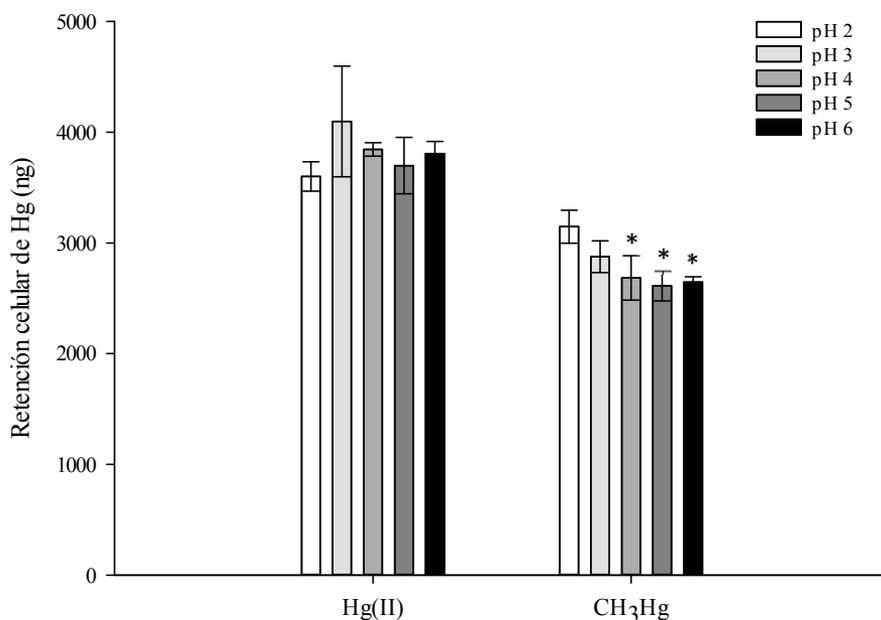


Figura 28. Efecto del pH sobre la retención de Hg(II) y CH₃Hg por *S. cerevisiae* BY4741. Valores expresados como ng de Hg (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de la retención respecto a la obtenida a pH 2.

También se ha estudiado la influencia del tiempo en la retención de Hg por la levadura, utilizando tiempos de incubación de 30, 60 y 120 min a 37 °C y pH 2. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 29. La retención de Hg(II) se incrementa significativamente con el tiempo de contacto, pasando de $35 \pm 1\%$ a los 30 min a $73 \pm 3\%$ a los 120 min. La retención de CH₃Hg, por el contrario, no experimenta variaciones ($88 \pm 3\%$ a 30 min; $82 \pm 2\%$ a 120 min), siendo elevada desde los 30 min de contacto. Estas diferencias podrían indicar que los mecanismos de interacción del Hg(II) y el CH₃Hg con la levadura son diferentes. Posiblemente para el Hg(II) se produzca una internalización del tóxico mientras que para el

CH₃Hg, su rápida retención podría indicar un proceso mayoritario de adsorción a superficie.

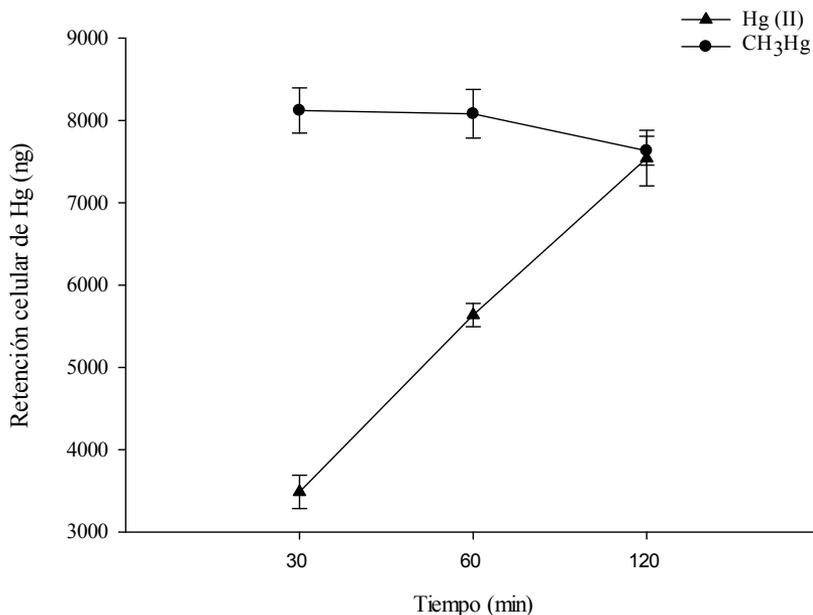


Figura 29. Efecto del tiempo de incubación sobre la retención de Hg(II) y CH₃Hg por parte de *S. cerevisiae* BY4741. Valores expresados como ng de Hg (media ± SD, n=3).

2. EFECTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y *S. CEREVISIAE* SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO EN DISOLUCIONES PATRONES

Las figuras 30 y 31 muestran el contenido de Hg soluble (bioaccesible) tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de bacterias lácticas a patrones de Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) respectivamente. Todas las cepas ensayadas reducen de forma significativa la bioaccesibilidad de Hg, siendo similar la reducción en ambas especies mercuriales [Hg(II): 72-98%; CH₃Hg: 74-97%]. De la cantidad inicial adicionada (1 mg/L), el contenido soluble tras la digestión gastrointestinal en

presencia de bacterias varía entre 0,019 y 0,29 mg/L para el Hg(II) y 0,023 y 0,23 mg/L para el CH₃Hg. Las reducciones observadas para ambas especies de Hg tras la digestión gastrointestinal son similares a las observadas por Alcántara *et al.* (2017) tras la incubación de estas bacterias con las disoluciones salinas de estos tóxicos, lo que indica que las condiciones gastrointestinales no afectan a la unión entre las bacterias lácticas y las especies de Hg.

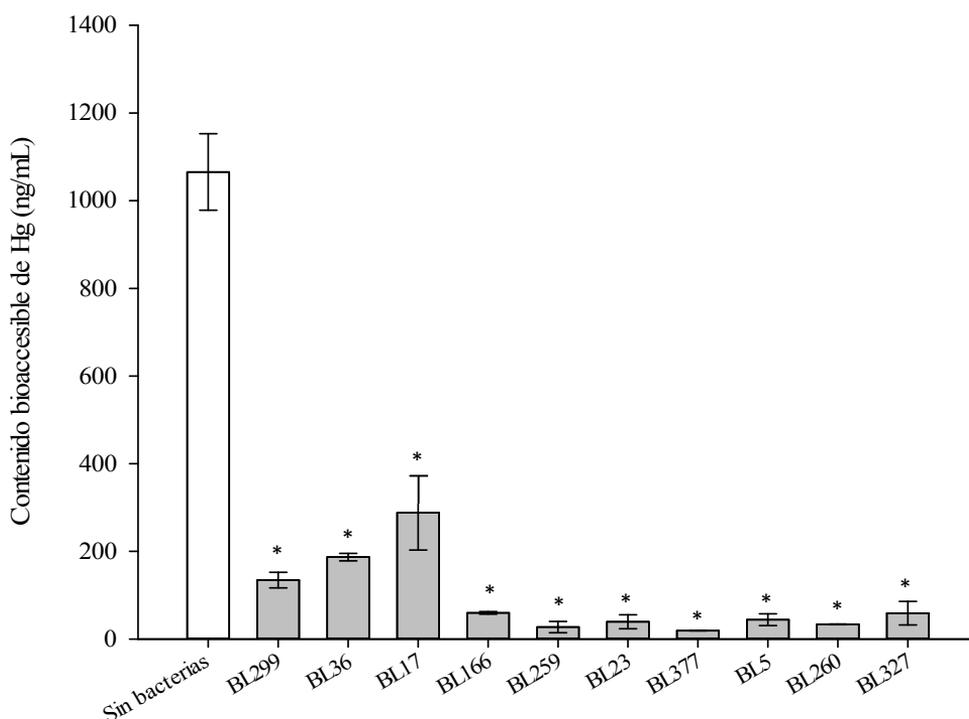


Figura 30. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de Hg(II). Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a patrones de Hg(II) (1 mg/L) en ausencia o presencia de bacterias lácticas (4 DO/mL). Valores expresados como ng de Hg/mL (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a las fracciones solubles obtenidas en ausencia de bacterias.

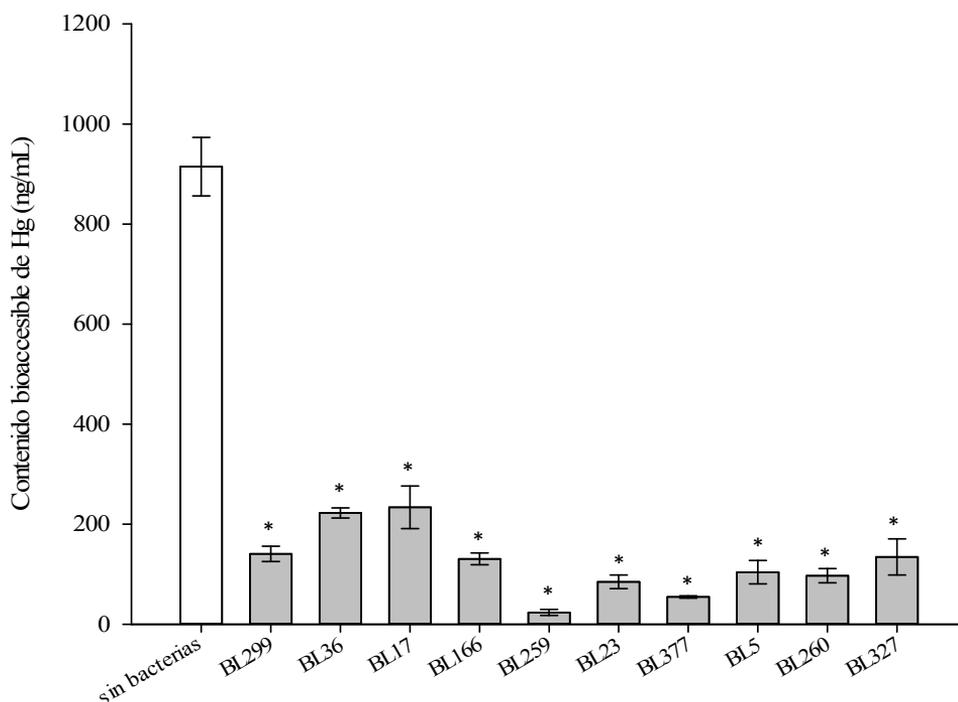


Figura 31. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de CH₃Hg. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a patrones de CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de bacterias lácticas (4 DO/mL). Valores expresados como ng de Hg/mL (media ± SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a las fracciones solubles obtenidas sin bacterias.

Las figuras 32 y 33 muestran la cantidad de Hg que queda soluble tras la digestión de patrones de Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) con distintas cepas de *S. cerevisiae*. Todas las cepas ensayadas reducen de forma significativa los contenidos de Hg bioaccesible [Hg(II): 75-100%; CH₃Hg: 64-96%]. De la cantidad inicial adicionada de Hg(II) (1 mg/L), la cantidad soluble tras la digestión con levaduras varía entre 0,015 y 0,22 mg/L. Para el CH₃Hg, cuya adición inicial fue de 0,84

mg/L, la cantidad soluble tras la digestión con levaduras oscila entre 0,032 y 0,30 mg/L.

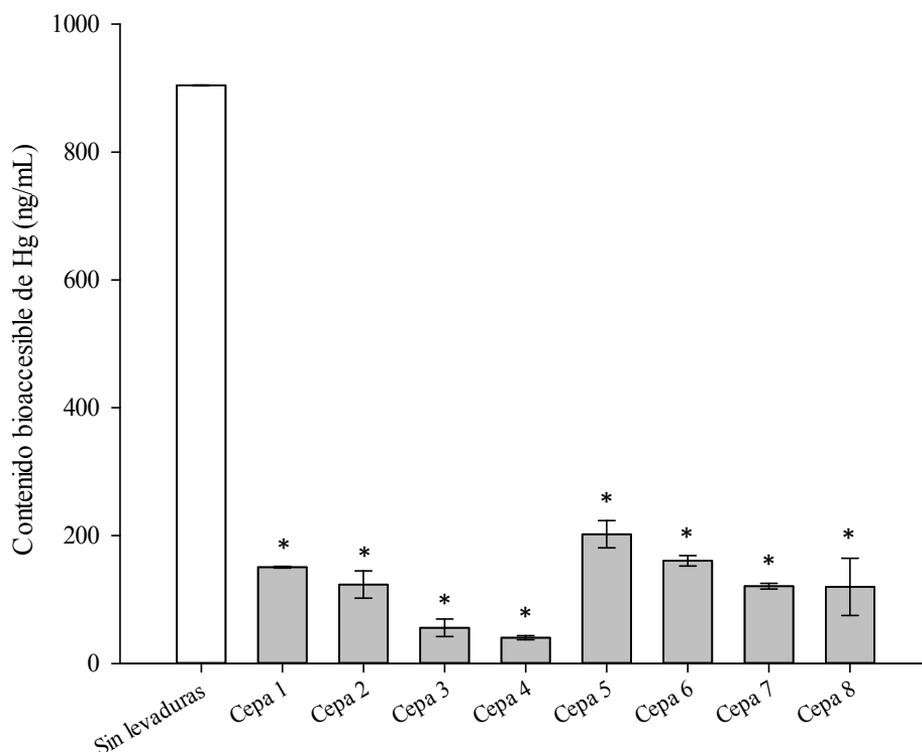


Figura 32. Efecto de las cepas de *S. cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de Hg(II). Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a patrones de Hg(II) (1 mg/L) en ausencia o presencia de varias cepas de *S. cerevisiae* (4 DO/mL). Valores expresados como ng de Hg/mL (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a las fracciones solubles obtenidas en ausencia de levaduras.

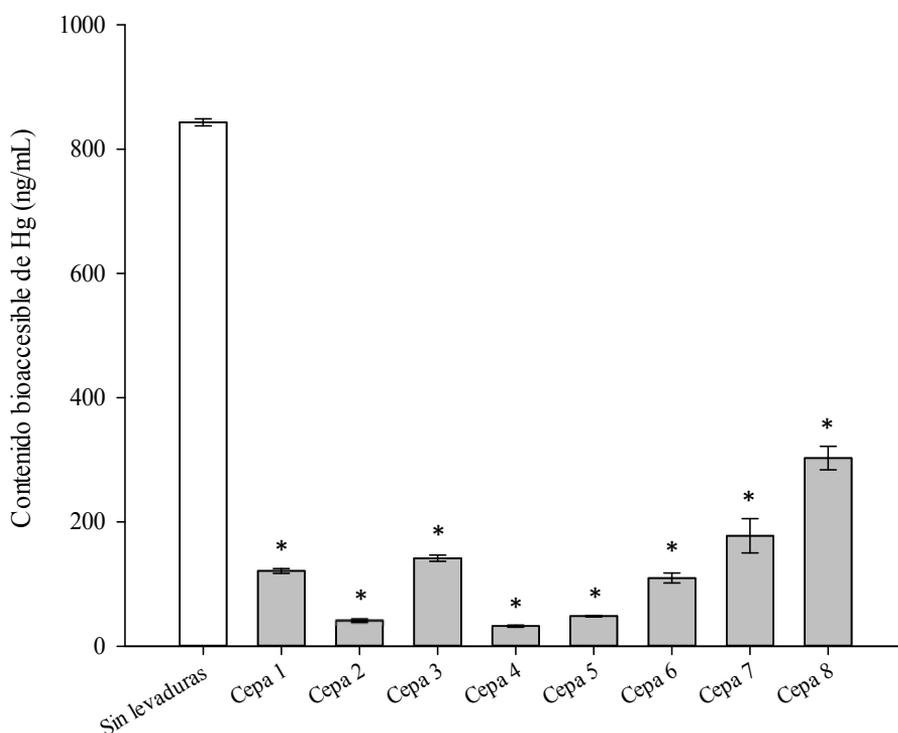


Figura 33. Efecto de las cepas de *S. cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad de disoluciones patrón de CH₃Hg. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a patrones de CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de varias cepas de *S. cerevisiae* (4 DO/mL). Valores expresados como ng de Hg/mL (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) con respecto a las fracciones solubles obtenidas en ausencia de levaduras.

Al igual que ocurre con las bacterias lácticas, la magnitud de la captación de los patrones de Hg es similar en condiciones de digestión gastrointestinal y en los ensayos donde sólo se aplica una incubación a 37 °C.

3. EFECTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y *S. CEREVISIAE* SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO EN ALIMENTOS

La presencia de bacterias de la cepa BL23 durante el proceso de digestión a una concentración de 4 DO/mL no conlleva cambios importantes en la fracción soluble de Hg obtenida tras la digestión de pez espada, atún y setas (figura 34), a diferencia de lo observado en disoluciones acuosas de patrones (apartado 2 del presente capítulo). Tampoco la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* tiene efecto en muestras de pez espada y atún (figura 35). Por el contrario, la adición de levaduras (4 DO/mL) si supone una reducción estadísticamente significativa del contenido bioaccesible en setas (reducción: 19-33%) (figura 35).

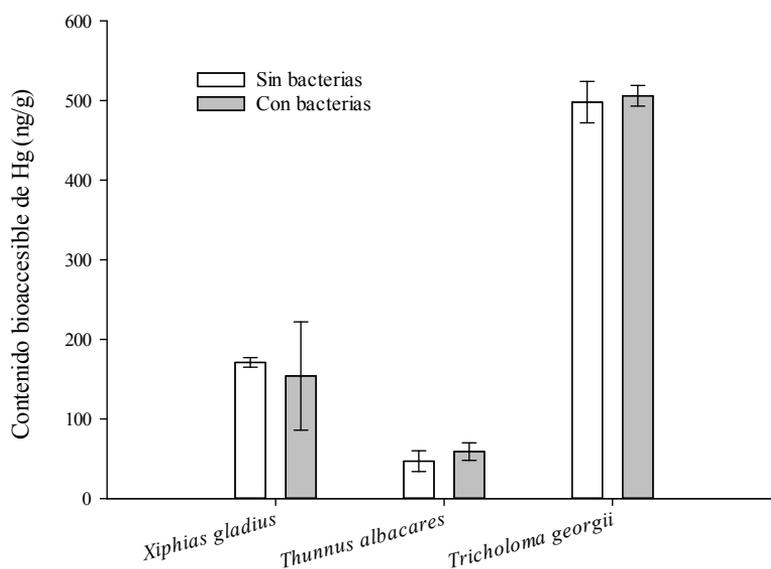


Figura 34. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a muestras de pez espada (*Xiphias gladius*), atún (*Thunnus albacares*) y setas (*Tricholoma georgii*) en ausencia o en presencia (4 DO/mL) de la cepa BL23. Valores expresados como ng de Hg/g de alimento (media \pm SD, n=3).

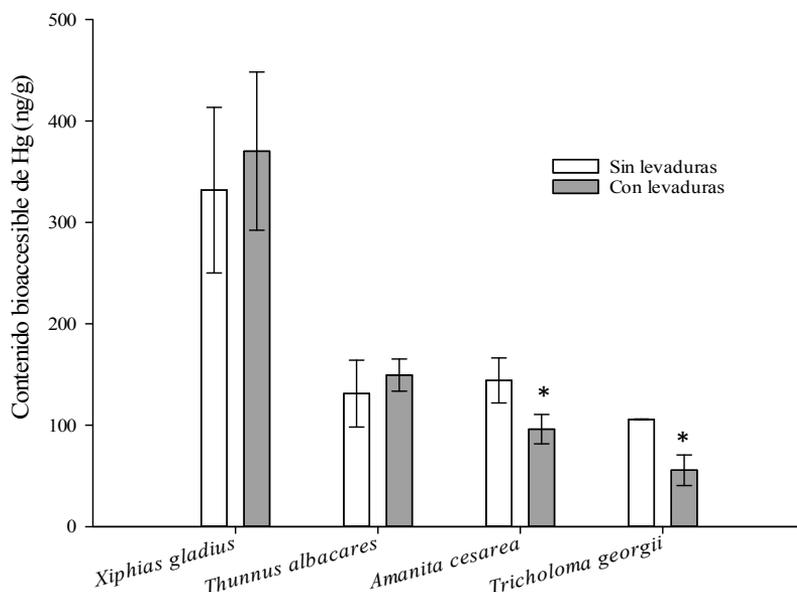


Figura 35. Efecto de las cepas de *S. cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a muestras de pez espada (*Xiphias gladius*), atún (*Thunnus albacares*) y setas (*Amanita cesarea* y *Boletus edulis*) en ausencia o en presencia (4 DO/mL) de levaduras. Valores expresados como ng de Hg/g de alimento (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin levaduras.

4. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL EFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE MERCURIO DESDE ALIMENTOS

Se evaluaron diversos factores que podrían ser la causa de la menor eficacia de bacterias y levaduras en la reducción de la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos en comparación con las elevadas reducciones evidenciadas en patrones acuosos (figuras 30-33).

4.1. Etapa digestiva

La aplicación de las etapas gástrica e intestinal conlleva cambios en los pHs, las concentraciones salinas y la adición de enzimas con distintas actividades en cada etapa. Todos estos cambios suponen modificaciones de las condiciones físico-químicas en las que se produce la interacción del Hg con las bacterias o levaduras. Adicionalmente estos cambios durante la digestión pueden producir la liberación de compuestos distintos desde la matriz alimentaria en cada etapa, los cuales pueden competir de forma diferente por los mismos mecanismos de internalización o adsorción que las formas mercuriales. Por este motivo, se evaluó si el efecto de las levaduras y bacterias sobre la bioaccesibilidad de Hg desde los alimentos podía estar influenciado por las condiciones existentes en cada etapa digestiva.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la adición de bacterias (4 DO/mL) al alimento no reduce la bioaccesibilidad del Hg en la etapa gástrica ni la etapa intestinal (datos no mostrados). En *Saccharomyces* tampoco se observan efectos sobre la bioaccesibilidad del Hg presente en pescados independientemente de la etapa digestiva analizada (datos no mostrados). Por el contrario, en setas si se observan diferencias entre ambas etapas (figura 36). En la etapa gástrica la presencia de levaduras no modifica la fracción solubilizada de la matriz; sin embargo al incorporar la etapa intestinal la levadura produce una importante reducción del Hg bioaccesible. Por lo tanto, en la combinación levadura/seta las condiciones de la etapa intestinal son las que favorecen la reducción de la bioaccesibilidad de Hg. Tal y como se ha evidenciado en el apartado 1 de este capítulo, el pH, uno de los parámetros que se modifica durante el paso de la etapa gástrica a intestinal, no afecta la unión de levaduras y especies mercuriales, por tanto, este parámetro no debe ser el responsable de las diferencias observadas entre ambas etapas digestivas. Además, tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo 1, la solubilización del Hg se produce principalmente en la etapa gástrica y, por tanto, desde el inicio del proceso digestivo el Hg está disponible para su

unión a las levaduras. Otra posible explicación es que exista algún efecto de los componentes de la propia matriz alimentaria que actúe sobre la unión levaduras/Hg y que éste se manifieste como resultado de alguna actividad enzimática o del cambio de pH.

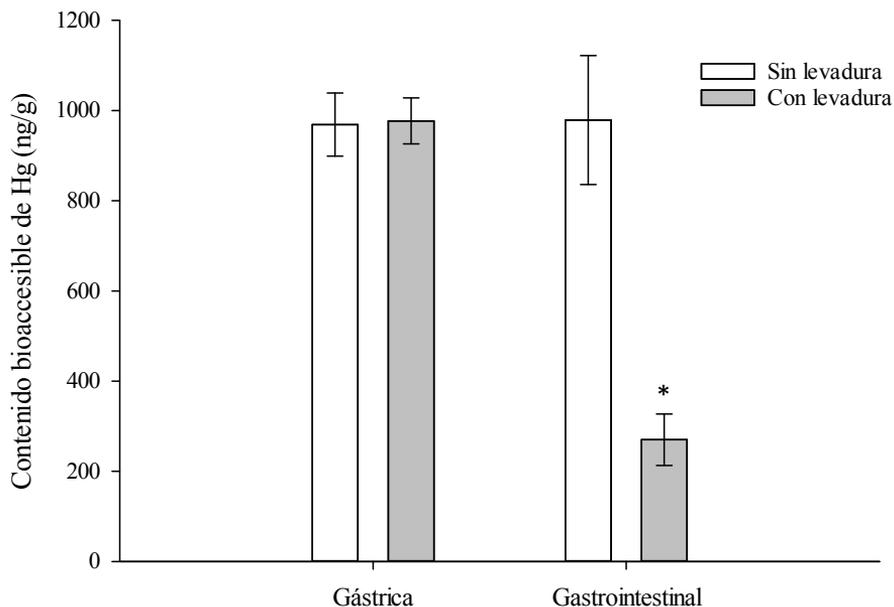


Figura 36. Efecto de las levaduras sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas en las distintas etapas de digestión. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gástrica o gastrointestinal completa a una muestra de seta (*Boletus edulis*) sin o con la adición de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* (4 DO/mL). Valores expresados como ng de Hg/g de seta (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin levaduras.

4.2. Concentración de bacterias y levaduras

El uso de densidades ópticas superiores a 4 (7-15 DO/mL para bacterias y 7-10 DO/mL en *S. cerevisiae*) no afecta la retención de Hg durante la digestión de muestras de pescado (datos no mostrados). El resultado para las muestras de setas es diferente ya que el aumento de la densidad óptica de bacterias supone una reducción de la bioaccesibilidad de Hg (figure 37). Esta reducción es elevada, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las tres densidades ópticas ensayadas (7 DO/mL: 36-56%; 10 DO/mL: 42-59%; 15 DO/mL: 57-68%).

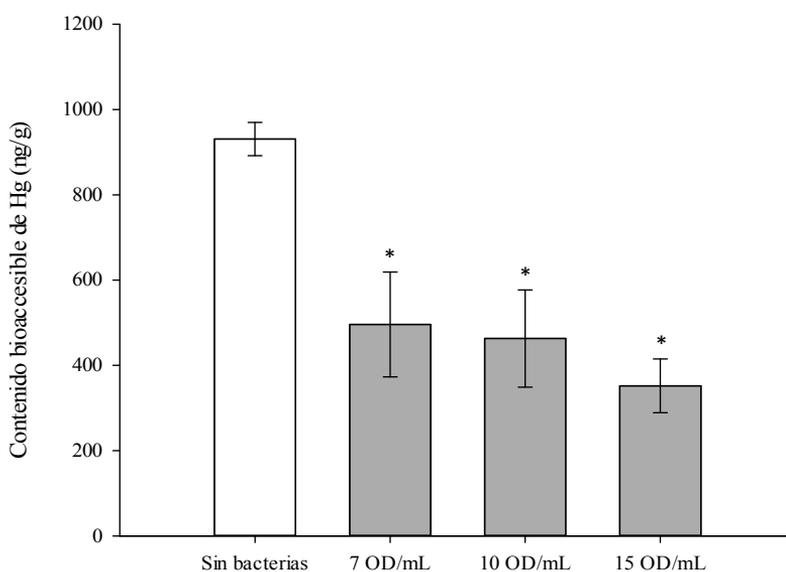


Figura 37. Efecto de la concentración de bacterias sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a una muestra de setas (*Boletus edulis*) sin o con la adición de cantidades crecientes de *Lactobacillus casei* (BL23). Valores expresados como ng de Hg/g de seta (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin bacterias.

Para *S. cerevisiae*, el aumento de la densidad óptica de 4 a 7 DO/mL no supone un incremento de la reducción de la bioaccesibilidad de Hg (4 DO/mL: 22%; 7 DO/mL: 28%) (figura 38). La densidad óptica es por tanto, un factor determinante en la captación de Hg durante la digestión gastrointestinal de setas por parte de las bacterias lácticas si bien carece de efecto significativo en *S. cerevisiae*.

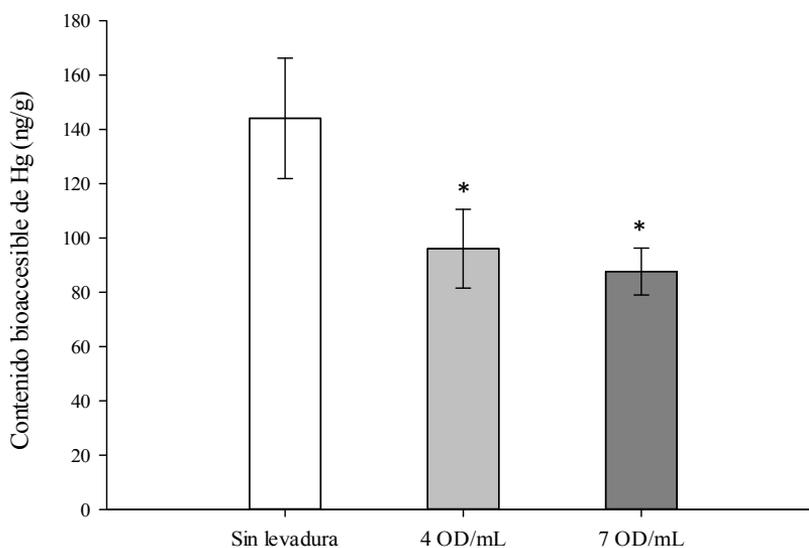


Figura 38. Efecto de la concentración de levaduras sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a una muestra de setas (*Boletus edulis*) sin o con la adición de cantidades crecientes de *S. cerevisiae* BY4741. Valores expresados como ng de Hg/g de seta (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin levaduras.

4.3. Presencia de cisteína y albúmina

La ineficacia de las bacterias y levaduras para reducir la bioaccesibilidad de Hg en las muestras de productos pesqueros podría deberse a que el Hg solubilizado desde

la matriz está en una forma química que no puede interactuar con estos microorganismos. Algunos estudios indican que en determinadas condiciones pueden generarse complejos del Hg con Cys o con otros polipéptidos o proteínas (Yasutake *et al.*, 1990; Krupp *et al.*, 2008; Watts *et al.*, 2014), incluso se ha puesto de manifiesto la presencia de estos complejos en la fracción bioaccesible de productos pesqueros (Cabañero *et al.*, 2007).

Las figuras 39 y 40 muestran la retención de Hg por bacterias lácticas y levaduras respectivamente, cuando en el medio de incubación hay Cys o BSA.

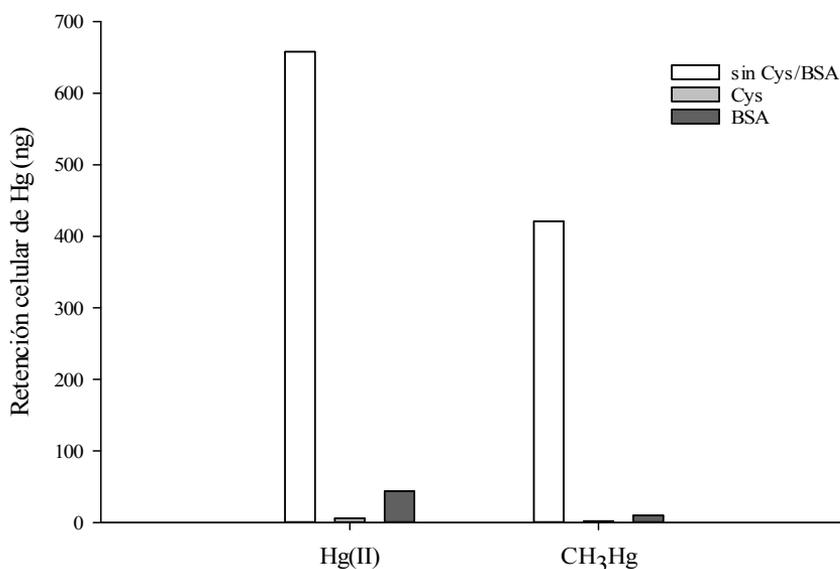


Figura 39. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las bacterias lácticas. Las barras representan los contenidos de Hg en las bacterias tras incubar durante 1 h la cepa bacteriana BL23 (4 DO/mL) con Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de Cys (5 mg/mL) o BSA (5 mg/mL). Valores expresados como ng de Hg (media, n=2).

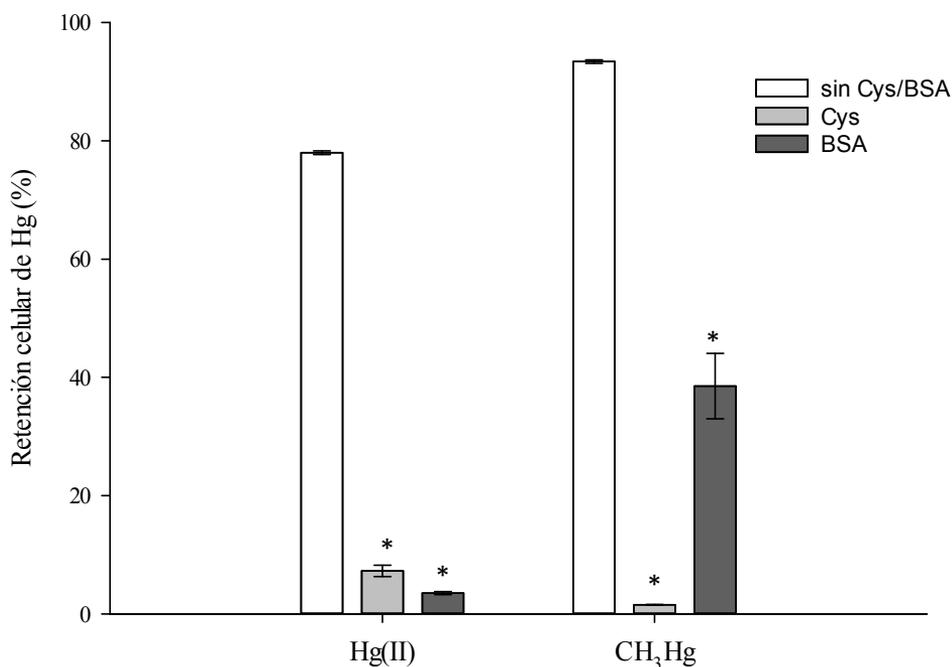


Figura 40. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las levaduras. Las barras representan los contenidos de Hg en las levaduras tras incubarse durante 1 h la cepa BY4741 (4 DO/mL) con Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de Cys (5 mg/mL) o BSA (5 mg/mL). Valores expresados como ng de Hg (media, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la incubación sin Cys y BSA.

La presencia de Cys prácticamente impide la retención de Hg(II) y CH₃Hg por parte de las bacterias lácticas (> 98% de reducción) y *S. cerevisiae* (> 93% de reducción). La albúmina produce una reducción de esta capacidad que es más variable. En bacterias lácticas, la reducción es también muy elevada para ambas especies mercuriales mientras que en *S. cerevisiae* el efecto sobre la retención de CH₃Hg no es tan notorio (38,5%).

Cuando se estudia si la presencia de estos componentes también afecta a la retención de Hg durante el proceso de digestión, nuevamente la Cys (5 mg/mL) anula la capacidad de retención de las bacterias. El efecto de BSA (5 mg/mL) es diferente al observado durante la incubación; la digestión gastrointestinal reduce la retención de Hg(II), aunque sigue apareciendo un 66 ± 1 % en las bacterias, y no afecta la retención de CH₃Hg (figura 41). Por lo que respecta a las levaduras, la presencia de ambos compuestos conlleva reducciones significativas de la cantidad de Hg retenida con respecto a los ensayos donde no se añaden estos compuestos al medio, siendo el efecto de la Cys más notorio, con reducciones superiores al 95% (figura 42).

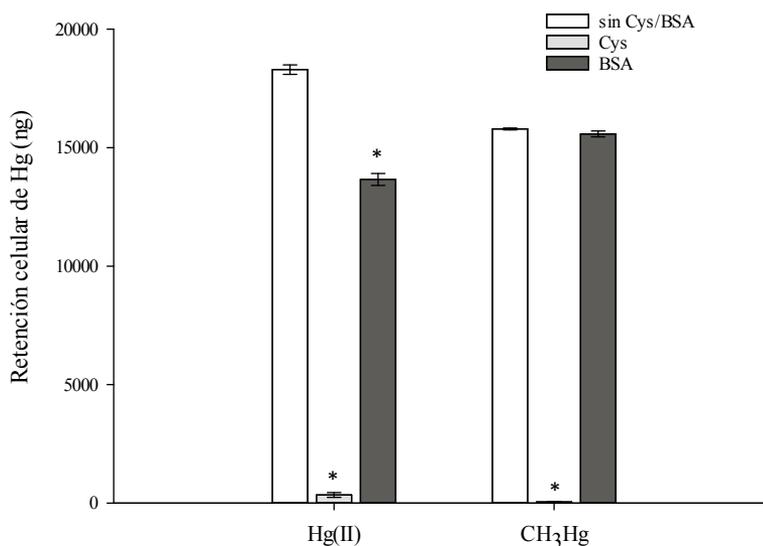


Figura 41. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las bacterias lácticas durante la digestión. Las barras representan los contenidos de Hg en las bacterias tras someter la cepa BL23 (4 DO/mL) con Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de Cys (5 mg/mL) o BSA (5 mg/mL) a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Valores expresados como ng de Hg (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la digestión sin Cys y BSA ($p \leq 0,05$).

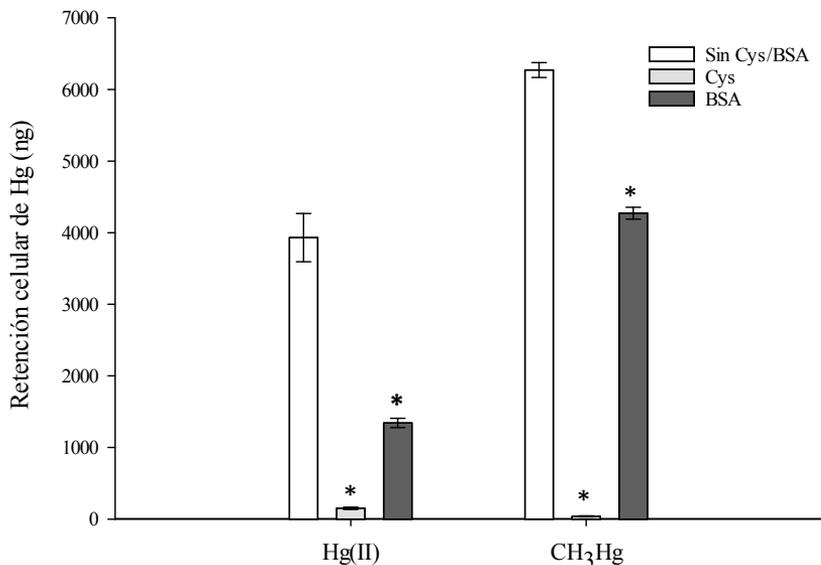


Figura 42. Efecto de la L-cisteína (Cys) y la albúmina de suero bovino (BSA) en la retención de Hg por las levaduras durante la digestión. Las barras representan los contenidos de Hg en las levaduras tras someter la cepa BY4741 (4 DO/mL) con Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de Cys (5 mg/mL) o BSA (5 mg/mL) a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Valores expresados como ng de Hg (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la digestión sin Cys y BSA ($p \leq 0,05$).

Los datos obtenidos en este estudio apuntan a que la formación de complejos del Hg con aminoácidos azufrados o proteínas presentes en los alimentos podría impedir la interacción del Hg con las bacterias y levaduras, no observándose las reducciones de la bioaccesibilidad esperadas tras los ensayos con patrones de las formas mercuriales (apartado 2 del presente capítulo).

4.4. Presencia de cationes divalentes

Otra posible causa que explicaría el escaso efecto de las bacterias y levaduras sobre la bioaccesibilidad de Hg en algunos alimentos sería la interacción de estos microorganismos con otros componentes de la matriz por los que tuviese mayor afinidad, impidiendo de esta forma la interacción con el Hg. Teniendo en cuenta las características de las especies mercuriales estudiadas, se ha evaluado esta posibilidad empleando cationes divalentes (Ca, Fe y Cu) con características similares al Hg. La retención de Hg por *L. casei* BL23 y *S. cerevisiae* BY4741 en presencia y ausencia de estos cationes se muestra en las figuras 43 y 44 respectivamente.

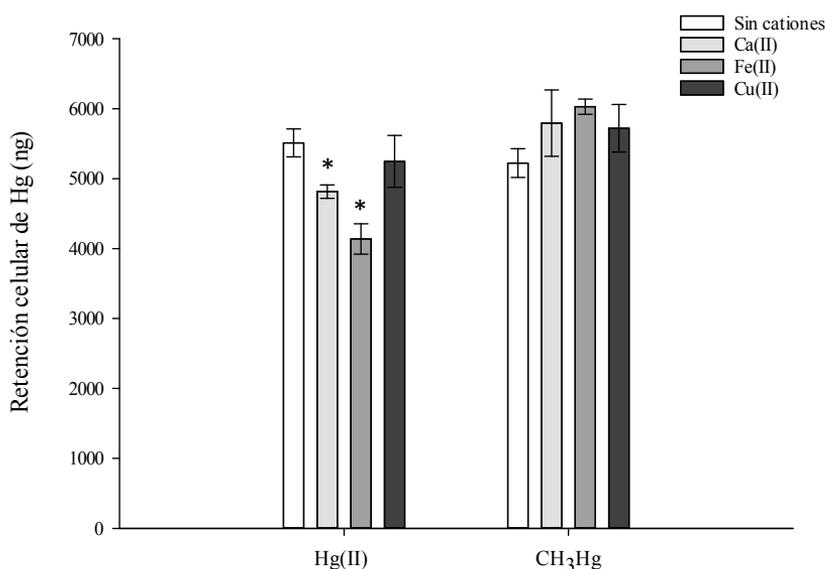


Figura 43. Efecto de determinados cationes divalentes en la retención de Hg por bacterias. Las barras representan los contenidos de Hg en las bacterias tras incubarse durante 1 h la cepa BL23 (4 DO/mL) con Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de Ca(II) (100 mg/L), Fe(II) (40 mg/L) o Cu(II) (40 mg/L). Valores expresados como ng de Hg (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin cationes.

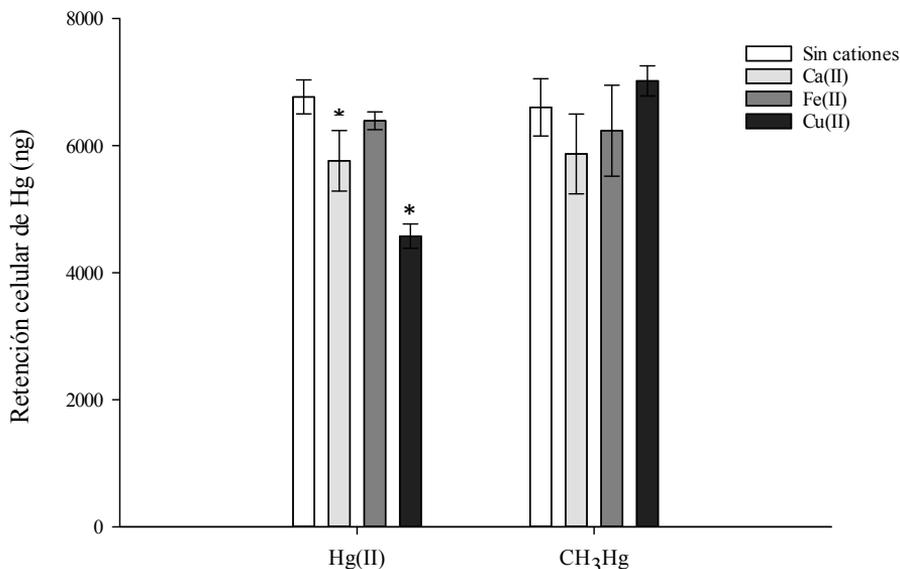


Figura 44. Efecto de determinados cationes divalentes en la retención de Hg por levaduras. Las barras representan los contenidos de Hg en las levaduras tras incubar durante 1 h la cepa BY4741 (4 DO/mL) con Hg(II) y CH₃Hg (1 mg/L) en ausencia o presencia de Ca(II) (100 mg/L), Fe(II) (40 mg/L) o Cu(II) (40 mg/L). Valores expresados como ng de Hg (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin cationes.

Los cationes ensayados no tienen efecto sobre la captación de CH₃Hg por bacterias o levaduras, pero sí producen reducciones en la retención de Hg(II). Así para bacterias lácticas, el Ca(II) y el Fe(II) reducen la cantidad de Hg inorgánico retenido, $12,6 \pm 1,7\%$ y $20,9 \pm 3,9\%$ respectivamente (figura 43). En el caso de *S. cerevisiae*, se observan reducciones en la retención de Hg(II) con Ca(II) ($17,6 \pm 3,4\%$) y especialmente con Cu(II) ($35,8 \pm 2,2\%$) (figura 44).

4.5. Cepa de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* empleada

Se seleccionaron cepas distintas a la BL23 y BY4741 para evaluar su efecto sobre la bioaccesibilidad del Hg presente en pez espada y setas. Las cepas ensayadas fueron BL17, BL259 y BL299 para bacterias lácticas (tabla 8) y las cepas 3, 4 y 5 para *S. cerevisiae* (tabla 9).

Al igual que ocurre con la cepa BL23 y BY4741, ninguna de las nuevas cepas modifica la bioaccesibilidad del Hg en pez espada (datos no mostrados). Asimismo, a la concentración de 4 OD/mL las nuevas cepas de bacterias lácticas tampoco influyen en la bioaccesibilidad de Hg en setas (datos no mostrados). Para *S. cerevisiae*, sí se evidencia una mayor eficacia en la reducción de la bioaccesibilidad en setas de las nuevas cepas respecto a la cepa BY4741 (cepa 3: $62 \pm 2\%$; cepa 4: $55 \pm 5\%$ y cepa 5: $64 \pm 2\%$) (Figura 45).

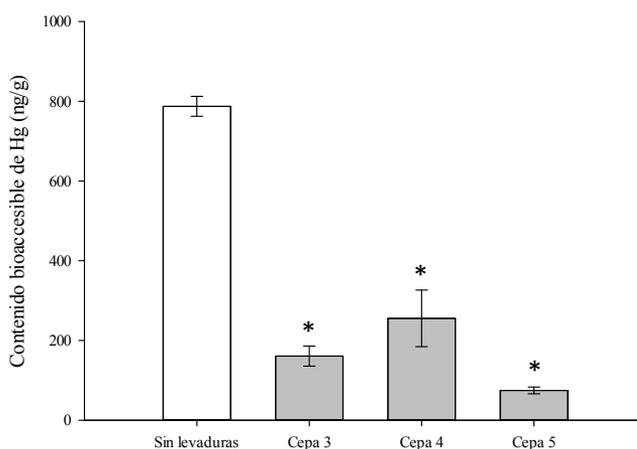


Figura 45. Efecto de la cepa de *S. cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad de Hg desde setas. Las barras representan la cantidad de Hg en la fracción soluble obtenida tras aplicar una digestión gastrointestinal a una muestra de seta (*Boletus edulis*) sin o con la adición de varias cepas de *S. cerevisiae* (4 DO/mL). Valores expresados como ng de Hg/g de seta (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la digestión sin levaduras.

5. EFECTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE CATIONES ESENCIALES Y LAS FORMAS QUÍMICAS DE MERCURIO

Para aquellos microorganismos y condiciones más eficaces reduciendo la bioaccesibilidad de Hg desde alimentos se ha estudiado el efecto de su adición sobre la bioaccesibilidad de otros elementos traza esenciales y sobre la especiación de Hg de las fracciones bioaccesibles. Tal y como se ha comentado en el capítulo 2 (sección 4 de los resultados), con estos ensayos se pretende determinar la idoneidad de las estrategias seleccionadas para su posible aplicación *in vivo*. Los estudios en productos pesqueros no se han llevado a cabo debido a que no se observan reducciones significativas de las fracciones solubles de Hg tras la digestión.

En tabla 17 se muestra el efecto de las bacterias lácticas y las cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas sobre la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de setas. La adición de cepas bacterianas a la digestión de setas no conlleva disminuciones de la bioaccesibilidad de ninguno de estos elementos esenciales. Para *S. cerevisiae*, sólo se observan reducciones importantes en los contenidos bioaccesibles de Ca para la cepa BL17 y BL299. Esta situación es muy diferente a la observada cuando se adicionan compuestos alimentarios, ya que estos producen reducciones elevadas de la bioaccesibilidad de los elementos esenciales en las setas deshidratadas (sección 4, capítulo 2).

	Cepas	Ca	Mg	K	Fe	P
Bacterias lácticas	BL17	16%	36%	12%	-10%	24%
	BL259	27%	-9%	6%	-10%	10%
	BL279	28%	8%	4%	13%	22%
<i>S. cerevisiae</i>	Cepa 3	-35%	38%	9%	-14%	3%
	Cepa 4	-21%	38%	8%	-1%	24%
	Cepa 5	-43%	30%	-1%	-6%	9%

Tabla 17. Modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de setas tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de bacterias lácticas o *S. cerevisiae*. Valores expresados como porcentajes respecto a las digestiones realizadas sin bacterias o levaduras (media, n=2). Los valores negativos indican reducciones en presencia de los microorganismos. En negrita se muestran las reducciones más relevantes.

Respecto a los datos sobre la composición mercurial de los bioaccesibles de setas en presencia o ausencia de bacterias lácticas o levaduras, se pone de manifiesto que no hay cambios tras la digestión. El Hg(II) es la especie mayoritaria en todas las condiciones analizadas (datos no mostrados). Por tanto, las cepas ensayadas no modifican la forma química del Hg durante el proceso digestivo.

DISCUSIÓN

El uso de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* en procesos de bioremediación ha despertado el interés de la comunidad científica en los últimos años. Este tipo de estrategias se consideran convenientes debido al bajo coste, la posibilidad de regeneración del bioadsorbente y la recuperación del metal.

Se ha descrito el empleo de bacterias lácticas en la eliminación de metales de efluentes industriales y de aguas residuales. Los géneros considerados potentes bioadsorbentes de metales incluyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus* y *Escherichia coli* (Ansari *et al.*, 2011). Los metales que han centrado la mayor parte de los estudios han sido Cd y Pb, sin embargo, el uso de bacterias para eliminar Hg en muestras medioambientales no ha sido investigado en profundidad. François *et al.* (2012) ponen de manifiesto una elevada captación de Hg(II) empleando cepas medioambientales con tolerancia al Hg aisladas de suelos, sedimentos y efluentes. Estos mismos autores demuestran que esta propiedad se extiende a la biomasa de bacterias muertas, cuya capacidad de unión es superior a la observada en bacterias vivas. Esta capacidad de quelación de Hg también es común en bacterias ácido-lácticas. Kinoshita *et al.* (2013), en su estudio de interacción de bacterias lácticas con varios metales/metaloideos, muestran que la capacidad de unión es dependiente del elemento considerado, siendo el Hg inorgánico el elemento que presenta una mayor captación de los estudiados [Hg(II) > Pb > Cd >>As(III)]. Alcántara *et al.* (2017) evidencian que las bacterias lácticas no sólo son capaces de retener Hg inorgánico, sino que también captan CH₃Hg aspecto muy importante desde el punto de vista de exposición dietaria ya que ésta es la forma mercurial más abundante en los alimentos.

Los estudios en los que se utiliza *S. cerevisiae* como estrategia de bioremediación son más escasos que los referentes a bacterias lácticas. En ellos se reporta una elevada capacidad de las levaduras para unir metales tales como Pb,

Cd, Cu, Al, Cr, Ni, Zn y Hg en disoluciones acuosas (Bakkaloglu *et al.*, 1998; Özer y Özer, 2003; Park *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2014). Algunos ensayos en muestras medioambientales indican su idoneidad para eliminar los metales de aguas residuales al actuar como quelantes y floculantes (Machado *et al.*, 2008, 2009). Infante *et al.* (2014) evidencian una elevada capacidad de *S. cerevisiae* en forma de preparado comercial para panadería en la captación de Pb (86%) y Hg(II) (70%) en disolución acuosa. No existen, sin embargo, datos sobre la capacidad de captación del CH₃Hg en disoluciones acuosas o muestras medioambientales.

El hecho de que las bacterias lácticas y determinadas cepas de *S. cerevisiae* puedan unir Hg en disolución acuosa, apunta a la posibilidad de emplear estos microorganismos como estrategias para evitar la absorción del metal ingerido a través de alimentos. Sin embargo, esta capacidad de interacción puede verse alterada debido a la presencia de componentes de la matriz alimentaria. Además, el hecho de que esta interacción deba ocurrir durante el tránsito del alimento a través del tracto digestivo, donde además de la complejidad del contenido luminal entra en juego el proceso digestivo, puede suponer cambios importantes en la magnitud de la interacción, pudiendo incluso llegar a anularla. Los resultados obtenidos en el presente capítulo muestran sin embargo, que en la mayoría de las ocasiones la capacidad de unión de estos microorganismos se mantiene tras el proceso digestivo. Las bacterias lácticas son capaces de captar Hg en las condiciones de digestión gastrointestinal, con reducciones de la fracción soluble de patrones de Hg(II) y CH₃Hg (72-98%). La reducción (36-68%) en setas se produce cuando la concentración de bacterias ensayadas se aumenta de 4 a 7 DO/mL. Las levaduras también son capaces de captar Hg en las condiciones de digestión gastrointestinal, con reducciones en la fracción soluble de las dos formas mercuriales [Hg(II) (89%) y CH₃Hg (83%)] y de las muestras de setas (hasta 64%). La reducción de la bioaccesibilidad de Hg, sin embargo, no se pone de manifiesto cuando se trata de productos pesqueros para ninguna de las condiciones ensayadas.

Se han descrito dos mecanismos básicos de captación de iones metálicos por parte de las bacterias lácticas: biosorción, proceso pasivo de unión de iones metálicos a la pared celular de las bacterias y bioacumulación, proceso en el cual los iones metálicos son transportados a través de la membrana celular y se acumulan en el interior celular. La mayoría de los estudios sobre las interacciones de bacteria lácticas con metales/metaloideos hacen referencia a la adsorción de los contaminantes metálicos a grupos funcionales de la superficie celular. Esta superficie se compone de una gruesa capa de peptidoglicano, ácidos (lipo)teicoicos, proteínas y polisacáridos. Algunas cepas producen además exopolisacáridos, que son liberados al medio circundante, pudiendo quedar ligeramente unidos a las bacterias formando una capa amorfa por fuera de la capa de peptidoglicano (Lahtinen *et al.*, 2004). Estas estructuras contienen varios grupos cargados negativamente (carboxilos, hidroxilos, aminas, tioles y fosforilos) capaces de unir cationes. De hecho, se ha puesto de manifiesto que la unión de otros cationes metálicos (Cd y Pb) se reduce considerablemente cuando se neutralizan las cargas negativas de los grupos carboxilo y fosforilo presentes en la superficie bacteriana (Zoghi *et al.*, 2014). La unión de las formas mercuriales a las bacterias lácticas parece también seguir este patrón de interacción. Se trata de un proceso que tiene lugar rápidamente, de hecho transcurridos 5 min desde el inicio de la incubación la mayor parte del Hg está unido a la biomasa (Alcántara *et al.*, 2017). La unión rápida sugiere un proceso superficial pasivo en lugar de una acumulación intracelular. Esta hipótesis se refuerza por los resultados obtenidos por Alcántara *et al.* (2017), donde se evidencia que las bacterias no viables presentan una capacidad de captación igual o mayor que las bacterias viables, indicativo de que no predominan mecanismos de captación intracelular.

La interacción de los metales catiónicos con *S. cerevisiae* es similar a la descrita para bacterias lácticas, existiendo un mecanismo de adsorción superficial y uno de internalización. La pared celular de *S. cerevisiae* está compuesta de varias capas

que también contienen numerosos grupos aniónicos capaces de interaccionar con cationes. La capa interna, que consiste en β -D-glucanos [$\beta(1,3)$ y $\beta(1,6)$ -D-glucanos] y quitina, representa 50-60% del peso seco de la pared. La capa externa está constituida por manoproteínas altamente glicosiladas. Se ha puesto de manifiesto la participación de los fosfomananos y los grupos carboxílicos de la proteína de la pared celular de *S. cerevisiae* en la unión de cationes metálicos (Seki *et al.*, 2005). En este capítulo se ha puesto de manifiesto que en el caso del CH_3Hg , la unión a *S. cerevisiae* es inmediata y por tanto podemos hablar también de un proceso mayoritariamente superficial. Sin embargo, en el caso de Hg(II) , la captación aumenta con el tiempo sugiriendo la posible coexistencia de mecanismos de adsorción superficial y transporte.

El hecho de que la reducción de la bioaccesibilidad con bacterias y levaduras no se ponga de manifiesto cuando se evalúan muestras de productos pesqueros podría estar relacionada con la forma en la que el Hg es liberado de la matriz alimentaria durante la digestión o bien a los complejos que forma este elemento con aminoácidos, polipéptidos o proteínas solubilizados de la propia matriz alimentaria durante el proceso digestivo. Cabañero *et al.* (2007) muestran que tras la aplicación de un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal a muestras de pez espada el Hg solubilizado, preferentemente CH_3Hg , aparece unido mayoritariamente a Cys. En este capítulo se ha evidenciado que la aplicación de la digestión simulada de patrones de Hg en presencia de Cys reduce significativamente, hasta casi anular, la capacidad de captar Hg de las bacterias lácticas y las levaduras, posiblemente por la formación de los complejos Hg/Cys anteriormente citados. La forma mercurial unida a Cys presenta propiedades físico-químicas muy distintas a las que tiene este metal en forma de sal. La neutralización de las cargas en los complejos $\text{CH}_3\text{Hg-Cys}$ puede dificultar la adsorción del Hg a la superficie de bacterias y levaduras. Adicionalmente, este cambio en la forma química del Hg puede afectar el transporte a través de determinados transportadores. El hecho de que las bacterias y levaduras

sólo sean eficaces reduciendo el Hg solubilizado desde setas, puede deberse a que en estas matrices alimentarias el Hg liberado tras la digestión no forme complejos con Cys. Hay que destacar que la mayoría de setas son deficientes en aminoácidos azufrados (Oyetayo *et al.*, 2007; Al-Enazi *et al.*, 2012).

Adicionalmente, la menor eficacia de las bacterias y levaduras reduciendo la bioaccesibilidad de Hg en las matrices alimentarias podría deberse al efecto de determinados componentes de la matriz, como es el caso de cationes divalentes, que presentan una elevada similitud estructural con las formas mercuriales y que por tanto pueden competir por los mismos mecanismos de captación. En el presente capítulo se ha evidenciado que la presencia de algunos cationes afecta significativamente la captación de Hg(II) por parte de los microorganismos, sin embargo no modifica la captación de CH₃Hg. Es especialmente notorio la reducción de la captación observada en *S. cerevisiae* cuando en el medio existe Cu(II). Los estudios sobre captación de Cu(II) por *S. cerevisiae* muestran una importante capacidad de retención de este elemento por parte de la levadura (Dutta *et al.*, 2015). Desideri *et al.* (1990), en un análisis por espectroscopía de absorción de rayos X llevado a cabo en células intactas de *S. cerevisiae*, muestran que el Cu acumulado en levaduras está exclusivamente coordinado a grupos sulfuro de proteínas. La unión de Hg a grupos tiol también está ampliamente documentada, incluso se considera una de las formas principales en las que el Hg se acumula y ejerce su toxicidad en otras células eucariotas (Clarkson y Magos, 2006). La presencia de Cu(II) puede interferir en la unión del Hg a los grupos tiol de las proteínas de la superficie celular. La competencia por la internalización en este caso es menos probable, debido a que en *S. cerevisiae* la mayor parte del transporte de Cu(II) se produce tras una reducción previa a Cu(I) y la intervención de mecanismos de transporte de alta afinidad (Crt1 y Crt3) para la especie monovalente de Cu y no para el catión divalente (Peña *et al.*, 2000), que es el que comparte similitudes estructurales con el Hg(II).

Finalmente hay que destacar que los tratamientos con bacterias lácticas y *Saccharomyces* que reducen la bioaccesibilidad de Hg, no reducen significativamente la bioaccesibilidad de elementos mayoritarios como el Ca, K, Mg, Fe y P, y que por tanto, a diferencia de lo evidenciado con algunos componentes alimentarios (capítulo 2), las estrategias con microorganismos de grado alimentario no deben tener un efecto negativo sobre la llegada de elementos esenciales a la circulación sistémica. Adicionalmente se ha comprobado que estos microorganismos no producen cambios de las formas químicas de Hg que puedan modificar la toxicidad de la fracción bioaccesible. En este sentido hay que destacar que estudios previos habían reportado cambios en el estado de metilación de las formas mercuriales por parte de microorganismos del tracto intestinal (Rowland *et al.*, 1984, 1986), biotransformaciones que, sin embargo, no se producen en presencia de los microorganismos ensayados.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio evidencian la captación de Hg(II) y CH₃Hg por parte de determinadas cepas de bacterias ácido-lácticas y levaduras *S. cerevisiae* en las condiciones existentes en una digestión gastrointestinal, posibilitando su utilización como estrategias para evitar la absorción de este metal cuando se ingiera con agua y alimentos. Sin embargo, su eficacia en productos pesqueros no es del todo evidente. Este hecho puede deberse a la aparición de complejos de Hg-Cys o Hg-polipéptidos en el digerido que no sean fácilmente captables por las bacterias y levaduras o bien a la presencia de componentes de la matriz que presentan los mismos mecanismos de interacción con estos microorganismos. Estos resultados podrían verse modificados *in vivo* debido a la composición e interacciones existentes en el lumen, más complejas que las emuladas con la digestión *in vitro*. Por tanto, son necesarios estudios *in vivo* para

confirmar lo hallado en el presente estudio, aspecto que se aborda en el capítulo 5. Asimismo, es de interés caracterizar los mecanismos implicados en la captación con el fin de poder diseñar estrategias adecuadas para la reducción de la exposición oral a Hg empleando estos microorganismos.

Este estudio evidencia que la evaluación de la bioaccesibilidad empleando disoluciones acuosas de los elementos traza constituye un punto de partida necesario en la investigación, pero sus resultados deben ser considerados como orientativos ya que pueden variar notablemente en presencia de la matriz alimentaria. Por ello, los hallazgos derivados de los estudios previos sobre el efecto beneficioso de los probióticos en la absorción y toxicidad de otros elementos traza tóxicos, llevados a cabo con dosificaciones orales de patrones acuosos, puede no ser extrapolables al diseñar estrategias para disminuir el riesgo de exposición a contaminantes vehiculados mayoritariamente a través de los alimentos.

Capítulo 4

Evaluación del efecto de los componentes alimentarios, las cepas de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* sobre el transporte intestinal de las formas mercuriales

Los capítulos 2 y 3 han puesto de manifiesto la posibilidad de reducir la cantidad de Hg que tras la ingesta llega a la circulación sistémica mediante el empleo de componentes alimentarios o microorganismos de grado alimentario capaces de disminuir la cantidad de elemento que queda soluble tras la digestión y que por tanto está disponible para la absorción. Otra forma de abordar el objetivo de reducir la llegada del tóxico a la circulación sistémica es actuando directamente sobre la absorción intestinal, es decir, sobre el transporte del tóxico a través de la pared gastrointestinal.

La absorción intestinal depende de las características fisicoquímicas de la sustancia y de sus interacciones con los distintos elementos del lumen y la superficie gastrointestinal. Tal y como se ha comentado en la introducción, la forma química del Hg es un factor determinante, siendo la absorción de la forma orgánica (> 95%) (NRC, 2000) muy superior a la del Hg(II) (< 15%, Rahola *et al.*, 1973; Piotrowski *et al.*, 1992). Otro factor determinante es el medio luminal; las interacciones del elemento con los componentes de la dieta o las bacterias intestinales presentes en el lumen pueden jugar un papel crucial en su absorción. Esta interacción puede generar compuestos diferentes al elemento presente inicialmente en el alimento cuya tasa de transporte sea inferior o superior. Asimismo, los componentes del lumen pueden interferir en el transporte por procesos de competencia. Los microorganismos pueden producir modulaciones de los mecanismos de transporte, debido a su efecto sobre las uniones intercelulares u otros componentes de la membrana celular. Las modificaciones de la absorción intestinal por componentes de la dieta o probióticos se han descrito para otros elementos traza tóxicos, principalmente el Cd y el Pb (Zhai *et al.*, 2015), pero no han sido estudiadas para Hg.

El objetivo de este capítulo es la búsqueda de componentes alimentarios y cepas de bacterias lácticas o *Saccharomyces* capaces de reducir la cantidad de Hg que puede ser transportado a través de la pared intestinal. Este estudio se ha realizado

empleando distintas líneas celulares de origen colónico, monocultivos de células Caco-2 y co-cultivos de NCM460 y HT29-MTX. Las células fueron expuestas a disoluciones patrón de Hg(II) y CH₃Hg, y a fracciones bioaccesibles de muestras de productos pesqueros, en presencia y ausencia de los componentes alimentarios y los microorganismos a estudiar. La evaluación del transporte a través de la monocapa se ha realizado mediante la determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}), parámetro que indica el flujo inicial de un compuesto a través de una monocapa celular normalizado por el área superficial de la membrana y la concentración de exposición.

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN PREVIA DE LA VIABILIDAD CELULAR

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad previos al diseño de los estudios de transporte con el fin de trabajar en condiciones subletales. Los resultados de viabilidad de los tres tipos celulares expuestos a concentraciones entre 0,5 y 2 mg/L de Hg(II) y CH₃Hg durante 4 h muestran que no existen reducciones importantes de la actividad mitocondrial (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que en los ensayos de transporte se trabaja a tiempos inferiores a 4 h, se puede considerar que la exposición a concentraciones iguales o inferiores a 2 mg/L no afecta de forma relevante la viabilidad celular.

2. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA CELULAR EN LOS ENSAYOS DE TRANSPORTE

En todos los ensayos presentados en este capítulo los valores de la RET y la permeabilidad de LY se han mantenido dentro de los límites establecidos para considerar la monocapa íntegra (apartado 9.3.4 de metodología). Asimismo, la viabilidad celular al final de cada ensayo, evaluada mediante tinción con azul de tripán, ha sido superior al 80% tal y como era de esperar por los datos previos de viabilidad (apartado 1). Atendiendo a estos resultados, se puede decir que se ha trabajado con monocapas íntegras y que los cambios observados al variar las condiciones de ensayo no son debidos a una desestructuración de la monocapa celular, si no al propio efecto del tratamiento.

3. COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD APARENTE EN LOS DISTINTOS MODELOS CELULARES EVALUADOS

Los modelos celulares empleados difieren en varios aspectos que pueden influir en distinta medida sobre el transporte de Hg. Los monocultivos Caco-2 forman monocapas celulares con un reducido espacio intercelular si se compara con el espacio existente entre los enterocitos del intestino delgado humano (sección 9.3 de la introducción). Por el contrario, los co-cultivos NCM460/HT29-MTX dan lugar a monocapas más laxas (Clemente *et al.*, 2017), con un espacio entre células más parecido al existente en el intestino delgado. Por otro lado, la presencia de las células HT29-MTX en los co-cultivos conlleva la generación de una capa de mucus, tal y como ocurre *in vivo*. Esta capa de mucus es una barrera física que puede afectar el paso de xenobióticos (Le Ferrec *et al.*, 2001) y también de microorganismos (Hansson, 2012), evitando que éstos entren en contacto con las células epiteliales del intestino.

La tabla 18 muestra los coeficientes de permeabilidad aparente de disoluciones patrón de Hg(II) (0,5 mg/L) y CH₃Hg (0,5 mg/L) en ambos modelos celulares. El rango de permeabilidades aparentes para CH₃Hg no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ambos modelos celulares. Sin embargo, el Hg(II) presenta un menor transporte en el monocultivo Caco-2 que en los co-cultivos. Tal y como se ha comentado anteriormente, las principales diferencias conocidas entre ambos modelos es el diámetro del espacio intercelular y la presencia de mucus. El mayor espacio entre células afecta principalmente a los compuestos que se mueven por difusión pasiva paracelular. El transporte de Hg(II) en forma de sales de cloruro se produce principalmente por vía transcelular y mediado por portador, no existiendo un transporte paracelular detectable en monocultivos Caco-2 (Vázquez *et al.*, 2015a). Por tanto, el hecho que los co-cultivos presenten una mayor apertura paracelular no debería suponer cambios en la permeabilidad de esta especie. Es posible que este cambio sea atribuible a la

expresión de transportadores específicos que no han sido estudiados en la presente tesis doctoral. La presencia de mucus tampoco supone una importante barrera, ya que son los co-cultivos NCM460/HT29-MTX los que presentan un mayor transporte de Hg.

Modelo celular	Especie	P_{app} ($\times 10^{-6}$, cm/s)
Caco-2	Hg(II)	1,00-4,43 (2,31)
	CH ₃ Hg	2,87-12,10 (4,37)
NCM460/HT29-MTX	Hg(II)	7,23-13,80 (10,90)
	CH ₃ Hg	5,76-7,55 (6,44)

Tabla 18. Coeficientes de permeabilidad aparente en los modelos celulares ensayados. Valores de P_{app} ($\times 10^{-6}$, cm/s) en monocultivos Caco-2 y co-cultivos NCM460 /HT29-MTX (80/20) expuestos a 0,5 mg/L de Hg(II) y CH₃Hg durante 2 h. Valores expresados como rangos y medianas (n=15).

4. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA PERMEABILIDAD DE MERCURIO

4.1. Efecto sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de Hg(II)

Los compuestos empleados para intentar reducir el paso celular de Hg(II) se han seleccionado en base a tres criterios principalmente: a) su posible competencia por transportadores de cationes divalentes [sales de Zn y Fe(II)]; b) su posible competencia por transportadores de aminoácidos, ya que se ha descrito que el Hg unido a Cys (Cys-S-Hg-S-Cys), una de las formas mayoritarias del Hg en muestras biológicas, presenta una estructura similar a la cistina y por tanto puede ser transportada por transportadores de este aminoácido (Bridges *et al.*, 2004)

(metionina, cisteína, fenilalanina, homocisteína, arginina, lisina); c) la posible formación de complejos con el Hg(II) que puede suponer una modificación de su transporte (glutación, albúmina, xilano, ácido lipoico, DHLA, pectina, cisteína, homocisteína, quercetina, ácido tánico).

La figura 46 muestra los porcentajes del P_{app} del Hg(II) en células co-expuestas a Hg(II) y los distintos componentes alimentarios con respecto al valor de permeabilidad obtenido en células tratadas sólo con Hg(II), considerado el tratamiento control. El 70% de los componentes producen P_{app} inferiores a las de las células tratadas con Hg(II) lo que evidencia que estos tratamientos reducen el transporte de Hg(II) a través de la monocapa de células intestinales. Las disminuciones más importantes en el transporte se producen en presencia de compuestos con grupos tiol como GSH ($97 \pm 3\%$), homocisteína ($94 \pm 2\%$), cisteína ($93 \pm 1\%$), DHLA ($89 \pm 2\%$) y ácido lipoico ($83 \pm 2\%$). También hay reducciones destacables con el catión Fe(II) ($65 \pm 4\%$) y con compuestos más complejos como la tiamina ($83 \pm 9\%$), la pectina ($78 \pm 2\%$), la quercetina ($73 \pm 1\%$), la epigallocatequina ($64 \pm 8\%$) y el ácido tánico ($57 \pm 16\%$).

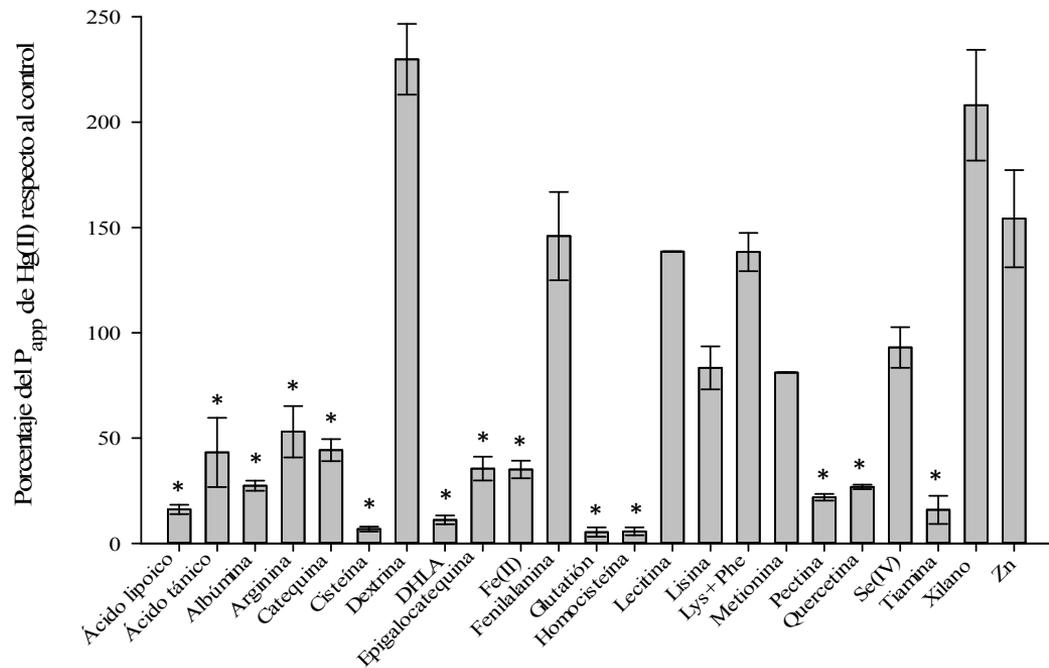


Figura 46. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de Hg(II). Las barras representan los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de células Caco-2 co-expuestas a Hg(II) (0,5 mg/L) y distintos componentes alimentarios durante 2 h. Valores expresados como porcentajes respecto a las células tratadas sólo con Hg(II) (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican reducciones estadísticamente significativas respecto a los tratamientos con Hg(II) únicamente ($p < 0,05$).

Muchas de las reducciones observadas en el transporte van acompañadas de disminuciones del contenido intracelular de Hg(II) (figura 47), siendo especialmente destacables las producidas por los compuestos tiolados [GSH ($98 \pm 1\%$), cisteína ($97 \pm 0,2\%$) y homocisteína ($94 \pm 1\%$)].

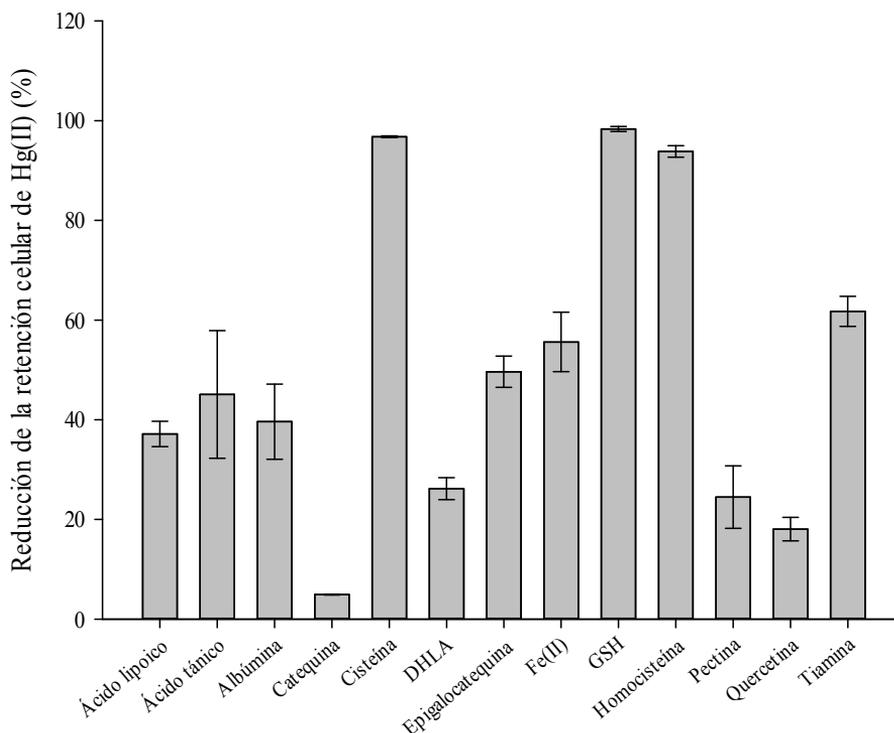


Figura 47. Efecto de los componentes alimentarios sobre la retención celular de Hg(II). Las barras representan los contenidos intracelulares en células Caco-2 co-expuestas a Hg(II) (0,5 mg/L) y distintos componentes alimentarios durante 2 h. Valores expresados como porcentajes respecto a las células tratadas sólo con Hg(II) (media \pm SD, n=3). Únicamente se han representado los componentes que producen disminuciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2. Efecto sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de CH₃Hg

La selección de compuestos para ensayar en la permeabilidad de la forma orgánica de Hg se ha basado en los mismos principios expuestos anteriormente para el Hg(II), excepto los relacionados con la competencia por los transportadores de cationes divalentes (sección 4.1 de este capítulo).

La gráfica 48 muestra los porcentajes del P_{app} del CH₃Hg en células tratadas con los componentes alimentarios con respecto a células tratadas únicamente con la forma mercurial. En general, hay que destacar que el número de compuestos capaces de modificar este parámetro en las células tratadas con CH₃Hg es muy inferior al que permite una modificación en Hg(II). De los 22 componentes analizados, únicamente las co-exposiciones con Cys (20 mg/L), GSH (1 mM), homocisteína (5 mg/L), albúmina (20 mg/L), tánico (20 mg/L) y quercetina (5 mg/L) presentan porcentajes inferiores de permeabilidad que las células tratadas sólo con CH₃Hg. En estos tratamientos se evidencian reducciones significativas de la permeabilidad del CH₃Hg [GSH (94 ± 10%), Cys (79 ± 4%), tánico (45 ± 6%), homocisteína (29 ± 2%), quercetina (24 ± 9%) y albúmina (21 ± 8%)].

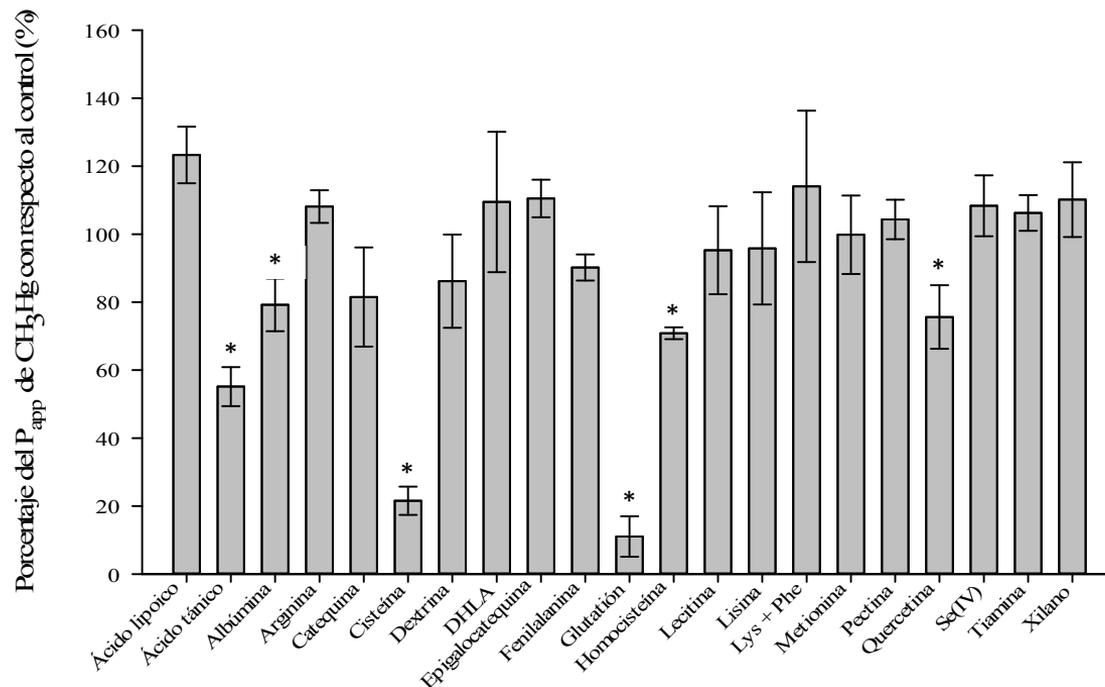


Figura 48. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de CH_3Hg . Las barras representan los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de células Caco-2 co-expuestas a CH_3Hg (0,5 mg/L) y distintos componentes alimentarios durante 2 h. Valores expresados como porcentajes respecto a las células tratadas sólo con CH_3Hg (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos con CH_3Hg únicamente (p < 0,05).

Las reducciones de la acumulación celular, al igual que ocurre con el Hg(II), se evidencian principalmente en aquellos tratamientos donde hay una reducción de la permeabilidad (figura 49). Las reducciones más relevantes presentan la siguiente gradación: GSH ($98 \pm 0,1\%$) > Cys ($91 \pm 2\%$) > ácido tánico ($30 \pm 6\%$) > homocisteína ($27 \pm 5\%$) > albúmina ($28 \pm 8\%$).

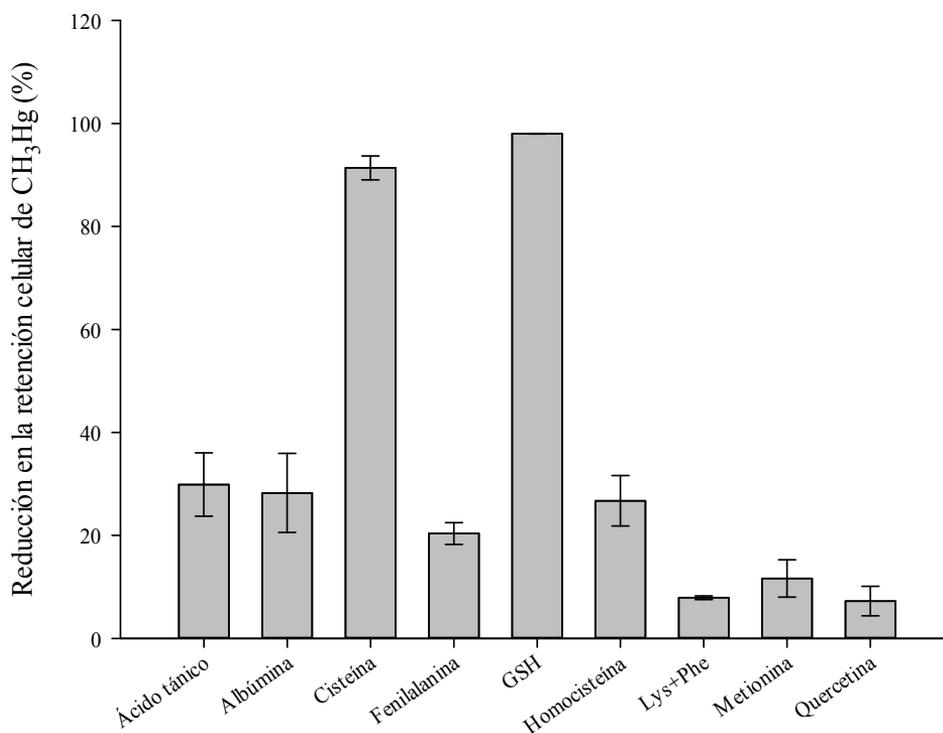


Figura 49. Efecto de los componentes alimentarios sobre la retención celular de CH₃Hg. Las barras representan los contenidos intracelulares en Caco-2 co-expuestas a CH₃Hg (0,5 mg/L) y distintos componentes alimentarios durante 2 h. Valores expresados como porcentajes respecto a las células tratadas sólo con CH₃Hg (media ± SD, n=3). Únicamente se han representado los componentes que producen disminuciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.3. Influencia de suplementos dietéticos y extractos vegetales en la permeabilidad de Hg(II) y CH₃Hg

Se han ensayado suplementos dietéticos o extractos vegetales que contienen alguno de los componentes que han sido exitosos reduciendo el P_{app} de las formas mercuriales (secciones 4.1 y 4.2). Así, se ha evaluado la reducción de la absorción de patrones de Hg(II) y CH₃Hg en presencia de extractos ricos en ácido tánico y/o epigallocatequina (té verde y semilla de uva) y tras la adición de suplementos de Cys, GSH, tiamina y ácido lipoico.

La figura 50 muestra las reducciones de la permeabilidad de Hg(II) y CH₃Hg en células Caco-2 diferenciadas. Los suplementos de ácido lipoico y tiamina no producen reducciones estadísticamente significativas de la permeabilidad de Hg(II) y CH₃Hg (datos no mostrados). El resto de suplementos o extractos son eficaces reduciendo la absorción de Hg(II) [extracto de té verde (mediana: 72%), extracto de semilla de uva (mediana: 66%) y suplemento de Cys/GSH (mediana: 32%)]. Las reducciones de la permeabilidad del CH₃Hg sólo se producen en presencia del suplemento de Cys/GSH (mediana: 57%) y del extracto de uva (mediana: 32%), no observándose reducciones estadísticamente significativas con el extracto de té verde.

De todos los tratamientos realizados con suplementos y extractos, sólo el suplemento Cys/GSH reduce significativamente los contenidos intracelulares de Hg(II) (43-65%, mediana: 60%) y CH₃Hg (84-86%, mediana: 86%).

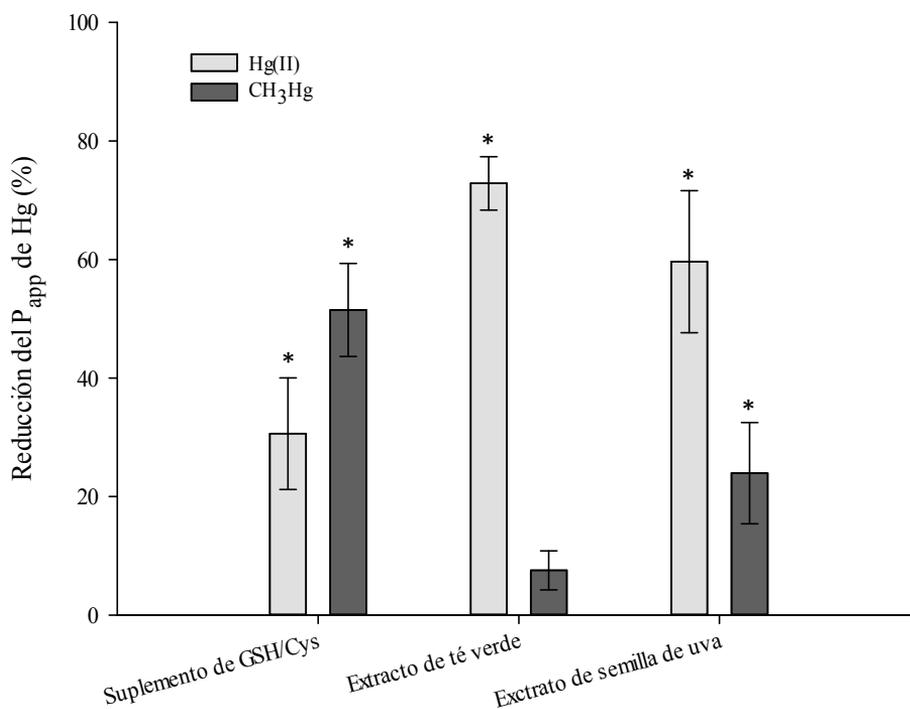


Figura 50. Efecto de los suplementos dietéticos o extractos vegetales sobre el transporte de Hg(II) y CH₃Hg. Las barras representan los porcentajes de reducción de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) en células Caco-2 co-expuestas a Hg(II) o CH₃Hg (0,5 mg/L) y distintos extractos vegetales o suplementos dietéticos (37 °C, 2 h). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos en las células tratadas sólo con Hg ($p < 0,05$).

4.4. Influencia de los componentes alimentarios y suplementos sobre la permeabilidad del Hg presente en alimentos

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en patrones de Hg (secciones 4.1-4.3 del presente capítulo) nos han permitido seleccionar aquellos componentes y suplementos o extractos a ensayar en alimentos. Atendiendo a los datos del capítulo

1, el pez espada presenta mayoritariamente CH₃Hg. Por ese motivo, se han ensayado aquellos suplementos que reducen principalmente la forma orgánica de Hg (GSH, Cys, homocisteína, ácido tánico, quercetina, suplemento de GSH y Cys y extracto de semilla de uva). La tabla 19 muestra el efecto de estos componentes o suplementos sobre la permeabilidad del Hg presente en la fracción bioaccesible de pez espada.

	P_{app} (× 10⁻⁵ cm/s)	Reducción del P_{app} (%)
Componentes alimentarios		
Sin componente	1,39 ± 0,40	
Cisteína	0,87 ± 0,14	37,5 ± 10,0*
GSH	0,65 ± 0,37	53,7 ± 21,7*
Homocisteína	0,91 ± 0,13	34,6 ± 9,6*
Ácido tánico	1,92 ± 0,81	—
Quercetina	1,50 ± 0,40	—
Suplementos o extractos		
Sin componente	3,69 ± 0,41	
Suplemento de Cys/GSH	2,50 ± 0,34	37,0 ± 10,6*
Extracto de semilla de uva	1,64 ± 0,82	63,8 ± 22,6*

Tabla 19. Efecto de los compuestos alimentarios y los suplementos dietéticos o extractos vegetales sobre el transporte de Hg desde pez espada. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de las monocapas Caco-2 expuestas durante 180 min a las fracciones bioaccesibles en presencia o no de los componentes, suplementos o extractos y reducción del P_{app} de Hg en presencia de estos compuestos (media ± SD; n=4-6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto a los ensayos de permeabilidad realizados sin componentes o suplementos (p < 0,05).

Al igual que ocurría en las disoluciones patrón (sección 4.2 del presente capítulo), el GSH es el componente alimentario más eficaz en la reducción de la permeabilidad de Hg desde la fracción bioaccesible, seguido de la cisteína y la homocisteína. Sin embargo, el ácido tánico y la quercetina no tienen ningún efecto sobre la permeabilidad. Adicionalmente hay que destacar la importante reducción que se produce en presencia de los dos suplementos ensayados (rango: 29-80%).

5. INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SACCHAROMYCES SOBRE LA PERMEABILIDAD DE MERCURIO

Todas las cepas lácticas y *Saccharomyces* ensayadas en el capítulo 3 presentaron una buena captación de las formas mercuriales en disolución, por tanto, el criterio para la selección de la cepa en este estudio no estuvo relacionado con su capacidad de quelación del metal sino con la facilidad de cultivo y su elevada tasa de crecimiento. Las cepas adicionadas a las disoluciones patrón y a los bioaccesibles de alimentos para la evaluación del transporte intestinal de Hg fueron BL23 y BL17 en el caso de las bacterias lácticas (tabla 8) y la cepa 5 y 7 de *Saccharomyces* (tabla 9).

En los ensayos con componentes se había trabajado con monocultivos Caco-2, pero la evaluación de la permeabilidad de Hg desde productos pesqueros fue complicada debido a que el transporte era menor que el observado para disoluciones patrón y los valores estaban próximos al límite de detección de la metodología de análisis. Ensayos preliminares de transporte del bioaccesible de pez espada con los co-cultivos NCM460/HT29-MTX (20/80) mostraron que, aunque los valores eran también bajos, los contenidos eran mayores. Por ese motivo, se decidió cambiar el modelo celular a un co-cultivo con células absortivas (NCM460) y secretoras de mucus (HT29-MTX). Estos tipos celulares, aunque menos empleados que la línea celular Caco-2, se han utilizado previamente en estudios de transporte intestinal

(Sahi *et al.*, 1998; Pontier *et al.*, 2001); incluso el co-cultivo ha sido utilizado para la evaluación de la permeabilidad de elementos traza (Clemente *et al.*, 2017).

Hay que resaltar que la adición de las bacterias lácticas y *Saccharomyces* a los cultivos celulares en los ensayos de transporte supone un aumento estadísticamente significativo de la RET (datos no mostrados), indicativo de que estos microorganismos reducen el paso paracelular. Este incremento se mantiene durante todo el tiempo de ensayo.

5.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de Hg(II) y CH₃Hg

La tabla 20 muestra la P_{app} de Hg(II) y CH₃Hg en HBSS a través de co-cultivos NCM460/HT29-MTX (20/80) en ausencia o presencia de las cepas bacterianas ensayadas. La presencia de BL23 y BL17 reduce significativamente la permeabilidad de Hg(II) (75-92%) a 0,3 DO/mL; sin embargo, la adición de las bacterias lácticas no conlleva reducciones de la permeabilidad de CH₃Hg a esta densidad óptica (tabla 20). El aumento del número de bacterias (0,6 DO/mL; Tabla 20), tampoco modifica la permeabilidad de la forma orgánica de Hg. Se requieren concentraciones de BL17 y BL23 mayores (1,2 DO/mL) para conseguir reducciones significativas de la permeabilidad de CH₃Hg (tabla 20).

	Tratamiento	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Reducción del P_{app} (%)
Hg(II)	Sin bacterias	7,05 \pm 0,83	
	BL17 (0,3 DO/mL)	1,75 \pm 0,23	75,2 \pm 3,2*
	BL23 (0,3 DO/mL)	0,57 \pm 0,11	91,9 \pm 1,6*
CH ₃ Hg	Sin bacterias	5,88 \pm 0,65	
	BL17 (0,3 DO/mL)	5,68 \pm 0,24	—
	BL23 (0,3 DO/mL)	5,39 \pm 0,49	—
CH ₃ Hg	Sin bacterias	7,23 \pm 1,45	
	BL17 (0,6 DO/mL)	5,85 \pm 0,63	19,1 \pm 8,7
	BL23 (0,6 DO/mL)	7,80 \pm 1,19	—
CH ₃ Hg	Sin bacterias	5,99 \pm 0,43	
	BL17 (1,2 DO/mL)	4,16 \pm 0,27	30,6 \pm 4,5*
	BL23 (1,2 DO/mL)	4,79 \pm 0,25	20,1 \pm 4,2*

Tabla 20. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de Hg y CH₃Hg. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29-MTX co-expuestos a Hg(II) o CH₃Hg (0,5 mg/L) y las cepas bacterianas (37 °C, 2 h) y reducción del P_{app} de Hg en presencia de estas cepas (media \pm SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto a los ensayos de permeabilidad realizados sin bacterias ($p < 0,05$).

5.2. Efecto de las levaduras sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de Hg(II) y CH₃Hg

La tabla 21 muestra la P_{app} de Hg(II) y CH₃Hg en HBSS a través de co-cultivos NCM460/HT29-MTX (20/80) en ausencia o presencia de las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas. A la densidad óptica ensayada, ambas cepas de levaduras reducen significativamente la permeabilidad de CH₃Hg y Hg(II), si bien la reducción de la permeabilidad de Hg(II) producida por la cepa 7 no es muy relevante.

	Tratamiento	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Reducción del P_{app} (%)
Hg(II)	Sin levaduras	10,90 \pm 0,33	
	Cepa 5 (1,3 DO/mL)	8,09 \pm 0,49	26,0 \pm 4,3*
	Cepa 7 (1,3 DO/mL)	9,89 \pm 0,19	8,6 \pm 0,6*
CH ₃ Hg	Sin levaduras	4,32 \pm 0,48	
	Cepa 5 (1,3 DO/mL)	1,44 \pm 0,40	66,6 \pm 9,4*
	Cepa 7 (1,3 DO/mL)	2,51 \pm 0,19	41,8 \pm 4,3*

Tabla 21. Efecto de *S. cerevisiae* sobre el transporte de Hg(II) y CH₃Hg. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29-MTX co-expuestos a Hg(II) o CH₃Hg (0,5 mg/L) y las cepas de levaduras (37 °C, 2 h), y reducción del P_{app} de Hg en presencia de estas cepas (media \pm SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto a los ensayos de permeabilidad realizados sin *S. cerevisiae* ($p < 0,05$).

5.3. Efecto de las bacterias lácticas y *Saccharomyces* sobre la permeabilidad del Hg presente en alimentos

La tabla 22 muestra la P_{app} del Hg presente en la fracción bioaccesible de pez espada a través de co-cultivos NCM460/HT29-MTX (20/80) en ausencia o presencia de las cepas de bacterias lácticas y de *S. cerevisiae* ensayadas. De todos los tratamientos ensayados, sólo la cepa 5 de *S. cerevisiae* presenta una reducción significativa del transporte del Hg presente en la fracción bioaccesible. El resto de tratamientos no muestran variaciones significativas, posiblemente consecuencia de la elevada variabilidad existente entre las muestras dentro de un mismo tratamiento. Así, aunque los porcentajes indican reducción, el tratamiento estadístico no reconoce diferencias significativas.

	P_{app} (cm/s)	Reducción del P_{app} (%)
Bacterias lácticas		
Sin bacterias	$(1,59 \pm 0,49) \times 10^{-6}$	
BL23 (1,2 DO)	$(0,91 \pm 0,14) \times 10^{-6}$	42,3 ± 8,9
BL17(1,2 DO/mL)	$(1,45 \pm 0,01) \times 10^{-6}$	8,5 ± 5,2
<i>S. cerevisiae</i>		
Sin levaduras	$(4,04 \pm 0,79) \times 10^{-7}$	
Cepa 5 (1,3 DO/mL)	$(2,08 \pm 0,33) \times 10^{-7}$	48,6 ± 8,2*
Cepa 7 (1,3 DO/mL)	$(2,60 \pm 0,67) \times 10^{-7}$	35,6 ± 16,6

Tabla 22. Efecto de las cepas de bacterias lácticas y levaduras sobre el transporte de Hg desde pez espada. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29-MTX expuestos durante 120 min a las fracciones bioaccesibles en presencia o no de las cepas, y reducción del P_{app} de Hg en presencia de estas cepas (media ± SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto a los ensayos de permeabilidad realizados sin microorganismos ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los mecanismos implicados en el transporte de Hg(II) y CH₃Hg son diferentes, tal y como se ha comentado en la introducción (sección 8.1). La forma salina inorgánica HgCl₂ se mueve principalmente mediada por transportador. En este sentido, Vázquez *et al.* (2015a) han evidenciado que el DMT1, transportador de cationes divalentes y principal mecanismo de absorción intestinal del Fe no-hemo, interviene en su transporte. En cuanto al CH₃HgCl debido a su carácter lipofílico, se apunta a que su absorción puede producirse principalmente por difusión pasiva a través de la monocapa celular (Vázquez *et al.*, 2014a). Adicionalmente se ha puesto de manifiesto la alta afinidad de las especies mercuriales por distintos grupos tiol, indicando que éstas pueden ser las formas mayoritarias de Hg en determinados alimentos y en órganos y fluidos corporales (Ballatori y Clarkson, 1985; Harris *et al.*, 2003). Algunos estudios señalan que estos complejos se transportan a través de transportadores de aminoácidos o transportadores de aniones orgánicos, ya que presentan una similitud estructural con los sustratos de estos transportadores (Ballatori, 2002).

El hecho de que el transporte de este metal esté mediado por transportadores de nutrientes, plantea la posibilidad de que su absorción a través del epitelio intestinal pueda reducirse por procesos de competencia con componentes de la propia dieta. Por otro lado, el empleo de compuestos dietarios que formen complejos con el Hg también puede afectar el transporte al modificar la forma química en la que el metal se encuentra en el lumen. Teniendo en cuenta estas posibilidades se han realizado ensayos en modelos celulares de epitelio intestinal, empleando cationes divalentes o aminoácidos como posibles competidores del transporte de ambas especies mercuriales, así como otros compuestos de origen alimentario que se ha puesto de manifiesto pueden formar complejos con Hg o con cationes con características fisicoquímicas similares. Los resultados obtenidos muestran que la inhibición del

transporte de la forma orgánica del Hg se consigue principalmente con compuestos que presentan grupos tiol en su estructura (cisteína, homocisteína, GSH y albúmina), con reducciones de hasta un 89% para el GSH, y en presencia de ácido tánico (55%) y quercetina (25%). El espectro de compuestos que reducen la absorción de Hg(II) es mucho mayor; además de los compuestos con grupos tiol, hay que destacar el importante efecto de las sales de Fe, del ácido tánico, la quercetina y la tiamina; siendo el GSH también el compuesto más eficaz (97% de reducción).

Las reducciones de la permeabilidad de las formas mercuriales evidenciadas con el ácido tánico y la quercetina son probablemente debidas a la formación de complejos con baja solubilidad. La quercetina es un flavonoide alimentario abundante en cebollas, té, tomates y manzanas (Aherne y O'Brien, 2002), que presenta una baja solubilidad en agua y que por tanto presenta una baja absorción intestinal (Cai *et al.*, 2013). Este flavonoide forma complejos con un gran número de cationes divalentes a través de los grupos 5-OH y 4-carbonilo, cuya estabilidad depende del ion metálico ensayado ($\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$) (Liu y Guo, 2015). Aunque se ha reportado que la interacción con metales aumenta la solubilidad de este flavonoide, ésta sigue siendo muy baja. Empleando concentraciones similares a las consumidas por la población se ha evidenciado en este capítulo una reducción importante del transporte y la retención celular de Hg en células intestinales. Su efecto sobre el Hg no ha sido estudiado previamente, pero posiblemente la formación de complejos de baja solubilidad sea el principal mecanismo por el que la quercetina reduce el transporte de Hg a través de la monocapa celular. Por otro lado, Lesjak *et al.* (2014) evidencian que la quercetina reduce la absorción intestinal de Fe(II) por quelación, pero que además actúa disminuyendo la expresión de la ferroportina, transportador de Fe no-hemo en el dominio basolateral de los enterocitos. Por tanto, además de su capacidad de unión, también existe un mecanismo molecular que afecta al propio transportador del

Fe(II). No hay que descartar que tenga lugar un efecto semejante para el Hg inorgánico ya que emplea transportadores del Fe no-hemo en su transporte en células intestinales (Vázquez *et al.*, 2015c). En cuanto al efecto del ácido tánico, la reducción de la solubilidad de las formas mercuriales en presencia de este compuesto ha sido puesta de manifiesto en el capítulo 2, donde se evidencian importantes reducciones del Hg soluble tras la digestión en presencia de concentraciones de ácido tánico semejantes a las empleadas en este estudio.

Otro mecanismo de reducción de la permeabilidad del Hg puede estar relacionado con la formación de complejos solubles pero cuyo transporte sea menor que el de las formas salinas de las especies mercuriales. Este puede ser el caso de compuestos con grupos tiol como la cisteína, homocisteína, albúmina y GSH. Varios estudios sugieren que las formas de Hg conjugadas con los grupos tiol son las formas transportadas mayoritariamente por diversos tejidos (Zalups, 2000; Bridges y Zalups, 2017), posiblemente porque se consideran las formas más abundantes en la circulación sistémica; sin embargo, los datos sobre la magnitud del transporte de los complejos con cisteína y las sales de Hg son contradictorios. Vázquez *et al.* (2014a, 2015a) muestran que en presencia de derivados de cisteína el transporte de HgCl y CH₃HgCl se reduce significativamente. Endo *et al.* (1991) llegan a la misma conclusión en ensayos *in situ*. La exposición de ratones con HgCl y cisteína supone una importante reducción de la absorción intestinal del Hg. Sin embargo, Mori *et al.* (2012), en exposiciones orales de ratas con CH₃HgCl o CH₃Hg-cisteína, no observan diferencias en las concentraciones plasmáticas de Hg. Asimismo, Roos *et al.* (2010), en un estudio también *in vivo*, observan una mayor acumulación del metal en hígado y cerebro en ratones dosificados con CH₃Hg-cisteína y una mayor acumulación renal en los grupos tratados con CH₃HgCl. En el caso de la forma orgánica, la formación de complejos supone un cambio en el grado de lipofilidad del CH₃Hg, y por tanto un cambio en la vía de entrada, de difusión pasiva a transporte mediado por transportador, lo que sin duda

conlleva un menor transporte debido a la existencia de un mecanismo de transporte sujeto a posibles competencias y saturaciones.

La reducción por parte de las sales férricas de la permeabilidad del Hg(II) es posiblemente consecuencia de la competencia por los mismos mecanismos de transporte. El principal transportador de Fe no-hemo presente en el dominio apical de enterocitos humanos es el DMT1. Este transportador presenta afinidad por una serie de cationes metálicos, entre los que se encuentra el Hg(II) (Vázquez *et al.*, 2015c). Por tanto, la presencia de sales de Fe(II) en concentraciones muy superiores a las de Hg(II) puede conllevar una reducción del transporte del metal tóxico por competencia. Este efecto sobre la permeabilidad del Hg(II) también se ha puesto de manifiesto en presencia de Mn(II) (Vázquez *et al.*, 2015a), otro sustrato que presenta alta afinidad por DMT1 (Garrick *et al.*, 2006). No se manifiesta sin embargo cuando se adiciona Zn(II) en el medio. Hay que destacar que el Zn también puede ser sustrato del DMT1, aunque este transportador presenta una menor afinidad por Zn(II) que por Fe(II) o Mn(II) (Garrick *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2012); de hecho, el Zn se transporta a nivel intestinal principalmente por las zrt-, irt-like proteins (ZIP) (Ford, 2004). Esta puede ser la causa de la falta de efecto del Zn sobre el transporte intestinal de Hg(II) observado en el presente capítulo.

Independientemente del mecanismo implicado en la modificación de la permeabilidad de las formas mercuriales se puede hablar de compuestos con una posible capacidad de reducir la biodisponibilidad de Hg que además tiene la ventaja de formar parte de alimentos, por tanto su uso como estrategias para reducir la exposición al tóxico debería ser seguro. Además, hay que destacar que los suplementos ricos en algunos de estos compuestos que han sido probados en este estudio y que están autorizados en el mercado tienen también una elevada eficacia (32-72%), hecho que hace más viable este tipo de estrategia. Adicionalmente se ha visto que son eficaces no sólo en disoluciones acuosas sino también en presencia de alimentos, matrices con una mayor complejidad en las que los nutrientes

presentes podrían variar las interacciones metal/estrategia dietaria; de hecho, en productos pesqueros se consiguen reducciones significativas con varios de estos componentes, suplementos o extractos vegetales.

Adicionalmente, en este estudio se ha podido comprobar que algunos microorganismos de grado alimentario, que previamente se había demostrado en el capítulo 3 eran capaces de captar Hg(II) y CH₃Hg, pueden también reducir el transporte de disoluciones patrón a través de las células intestinales. No existen estudios *in vitro* donde se determine el efecto de las bacterias lácticas y *S. cerevisiae* sobre la captación celular de metales; sin embargo, existen algunos estudios *in vivo* donde se demuestra que existe una menor absorción intestinal de metales en presencia de cepas de bacterias lácticas (Tian *et al.*, 2012; Zhai *et al.*, 2013, 2014). No tenemos conocimiento de que se hayan hecho estudios empleando cepas de *S. cerevisiae*.

Hay que destacar que también se ha evidenciado en el presente estudio un efecto reductor de la permeabilidad del Hg presente en la fracción de bioaccesible de pez espada por parte de las bacterias y levaduras. Tal y como se ha demostrado en el capítulo 3, estos microorganismos no son capaces de captar el Hg presente en el pez espada. Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en patrones acuosos, la reducción en la permeabilidad de Hg en pez espada no está relacionada con la captación de las formas mercuriales por parte de los microorganismos. A lo largo del estudio con bacterias y levaduras se ha visto un aumento de la RET y una reducción del paso paracelular del marcador LY. La modulación de la permeabilidad paracelular de las monocapas intestinales está en gran medida gobernada por las proteínas que conforman las uniones intercelulares (Anderson y Van Itallie, 2009). Se ha puesto de manifiesto que las bacterias lácticas pueden aumentar la expresión de estas proteínas e incrementar la función barrera en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Ulluwishewa *et al.*, 2011). También se ha puesto de manifiesto que algunas cepas de *S. cerevisiae*, especialmente la variedad *boulardii*

(cepa 5 de nuestro estudio), favorecen la restauración de las uniones estrechas y la permeabilidad de la barrera intestinal tras infecciones bacterianas (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010). La reducción del paso paracelular generada por estos microorganismos no debería afectar en principio el transporte de las formas salinas de Hg, cuya vía paracelular es despreciable, pero puede afectar la permeabilidad de la forma de Hg presente en el bioaccesible de pez espada, que tal y como se ha comentado en el capítulo 3, podría ser algún tipo de complejo Hg/compuesto tiolado.

Finalmente hay que destacar que la mayoría de los compuestos o probióticos eficaces en la reducción de la permeabilidad de Hg en las células intestinales son compuestos con una elevada capacidad antioxidante, la cual podría contrarrestar el estrés generado por el Hg. Estudios *in vivo* han evidenciado que la administración de quercetina (5-50 mg/kg pc/día) disminuye el estrés generado por el CH₃Hg (30 µg/kg pc/día, durante 45 días), con una recuperación de los niveles de GSH y de la actividad glutatión peroxidasa en ratas expuestas (Barcelos *et al.*, 2011). El efecto antioxidante del ácido tánico se ha puesto de manifiesto en estudios *in vivo* donde los animales se exponen a Cd y Pb (Mishra *et al.*, 2015; Tüzmen *et al.*, 2015), metales cuyos mecanismos de toxicidad son similares a los descritos para las formas mercuriales. Asimismo, se ha caracterizado la actividad antioxidante de algunas cepas de bacterias lácticas que radica en su capacidad para quelar radicales libres (Lin y Yen, 1999) y se ha comprobado que en animales expuestos a Cd y Pb reduce la toxicidad asociada (Zhai *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que el consumo dietario de bacterias lácticas, *Saccharomyces*, compuestos con grupos tiol, flavonoides como la quercetina, polifenoles como el ácido tánico, extractos vegetales o suplementos

ricos en los mismos puede ser una estrategia adecuada para reducir la biodisponibilidad oral de Hg. Es necesario evaluar si este efecto observado *in vitro* se confirma *in vivo*. Este va ser uno de los objetivos del capítulo 5.

Los compuestos ensayados no deberían ser perjudiciales, pues a las concentraciones empleadas en el presente estudio forman parte de una dieta habitual; sin embargo, es necesario constatar, antes de plantearse su uso como estrategias dietarias para la reducción de la absorción de Hg, que su aplicación no produce efectos adversos mediante ensayos en animales de laboratorio. Se ha visto que algunos de estos productos también pueden interferir en la absorción de minerales. Lesjak *et al.* (2014) evidencian una reducción de la absorción de Fe(II) en roedores tratados con quercetina y Afsana *et al.* (2004) una menor biodisponibilidad de Fe en animales tratados con ácido tánico. La reducción de la absorción de elementos esenciales, tal y como hemos indicado previamente, no es deseable si tenemos en cuenta que este tipo de estrategia podría ser empleada en futuras intervenciones poblacionales.

Capítulo 5

Evaluación *in vivo* del efecto de componentes alimentarios y cepas de bacterias lácticas sobre la biodisponibilidad de las formas mercuriales

Los resultados obtenidos en los capítulos 2, 3 y 4 han mostrado que pueden existir compuestos alimentarios o microorganismos de grado alimentario capaces de disminuir la cantidad de Hg(II) y CH₃Hg que llega a la circulación sistémica tras la ingesta, tanto en disoluciones acuosas como en alimentos. Estos compuestos o microorganismos podrían ser por tanto, una alternativa viable para la reducción de la exposición oral a Hg. Tal y como hemos indicado a lo largo de la tesis, las interacciones *in vitro* de estas estrategias con las formas mercuriales pueden experimentar importantes modificaciones *in vivo* debido a la composición del lumen y a toda una serie de factores propios del individuo. La mayoría de estrategias exitosas *in vitro* tiene como base la formación de complejos con las formas mercuriales o la captación de las mismas en el caso de las bacterias lácticas y levaduras. Estos complejos o uniones pueden verse alterados por los distintos procesos que ocurren en el tracto gastrointestinal, sin olvidar el metabolismo presistémico mediado por la microbiota intestinal y las células epiteliales del intestino. Por tanto, es necesario evaluar si estas reducciones de la biodisponibilidad se producen *in vivo*.

En este capítulo se ha abordado este objetivo empleando tres componentes de la dieta (Cys, ácido tánico y HPMC) y dos cepas de bacterias lácticas (BL23 y BL17) seleccionadas en base a los resultados de los capítulos anteriores. De los componentes alimentarios finalmente seleccionados, el ácido tánico y la HPMC han producido reducciones importantes de la cantidad de Hg solubilizada durante la digestión (capítulo 2), mientras que la Cys no reduce la bioaccesibilidad, pero disminuye considerablemente el transporte y la acumulación de Hg(II) y CH₃Hg en las células intestinales (capítulo 4). En el caso de las bacterias se ha evidenciado que ambas cepas son capaces de retener una gran parte del Hg adicionado en forma de patrones acuosos o del Hg presente en algunos alimentos (capítulo 3), influyendo en el transporte a través de las células intestinales (capítulo 4).

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE DISOLUCIONES PATRÓN DE MERCURIO

Los ensayos iniciales realizados empleando distintas concentraciones de las formas mercuriales (0,1-1 mg/kg pc) tenían como objetivo seleccionar las concentraciones más bajas que permitieran la cuantificación del metal en un rango adecuado para considerar los datos robustos y fiables. Las concentraciones de inicio se eligieron teniendo en cuenta los estudios toxicológicos existentes en ratones.

La dosis letal 50 (LD₅₀) reportada en ratones para el Hg(II) oscila entre 33 y 52 mg/kg pc, dependiendo de la sal de Hg analizada. Nielsen *et al.* (1991) muestran que en una exposición única por sonda gástrica no existen efectos a nivel renal, principal órgano diana del Hg(II), a concentraciones iguales o inferiores a 5 mg/kg pc. Exposiciones más prolongadas (26 semanas) a dosis entre 1,25 y 20 mg/kg pc/día por sonda muestran vacuolización citoplasmática del epitelio del túbulo renal en ratones expuestos a concentraciones iguales o superiores a 3,7 mg/kg pc/día (NTP, 1993). Se ha propuesto una NOAEL (dosis en la que no se ponen de manifiesto efectos adversos) de 0,93 mg/kg pc/día para efectos renales en roedores expuestos por sonda a Hg(II) durante 14 días (NTP, 1993).

La LD₅₀ del CH₃Hg reportada en ratones es de 57,6 mg/kg pc (Young, 1992). Se han evidenciado efectos neurotóxicos en animales expuestos durante 60 días a concentraciones iguales o mayores a 1 mg/kg pc/día vía sonda gástrica (Young, 1992). Los estudios en ratones muestran LOAELs (dosis donde se observan efectos adversos mínimos) para efectos neurotóxicos de 4 mg/kg pc/día para una exposición de 7 días y 0,6 mg/kg pc/día para una exposición de 2 años (NRC, 2000).

Atendiendo a los datos bibliográficos expuestos podemos decir que el rango de concentraciones de Hg seleccionado para este estudio no debe conllevar toxicidad, al menos durante el período de tratamiento planteado (48-72 h). Las figuras 51 y 52 muestran la concentración del Hg plasmático a distintos tiempos tras la administración de una única dosis de Hg(II) y CH₃Hg respectivamente.

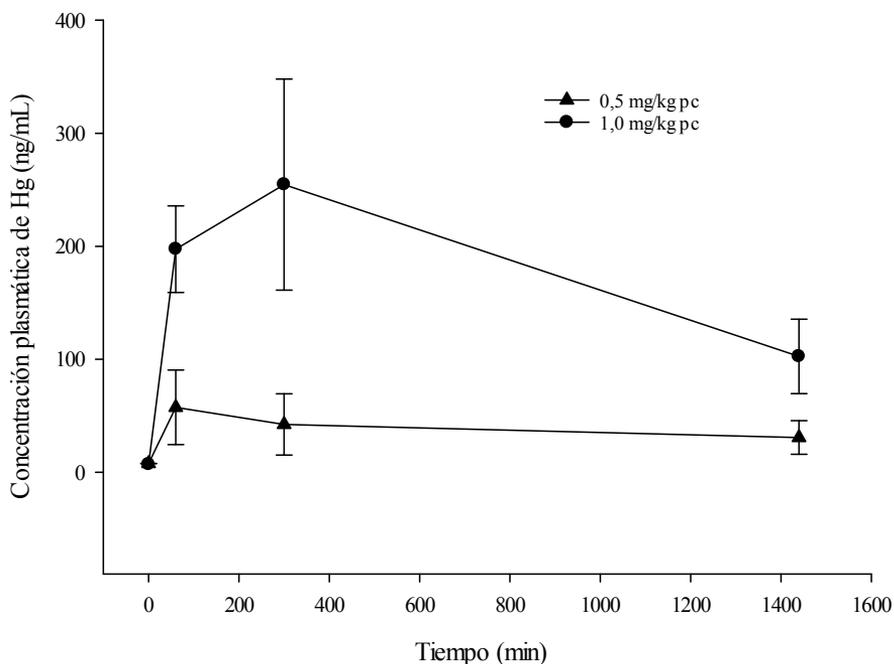


Figura 51. Concentración de Hg en plasma en función del tiempo en ratones expuestos a Hg(II). Valores expresados como ng Hg/mL (media ± SD, n=5).

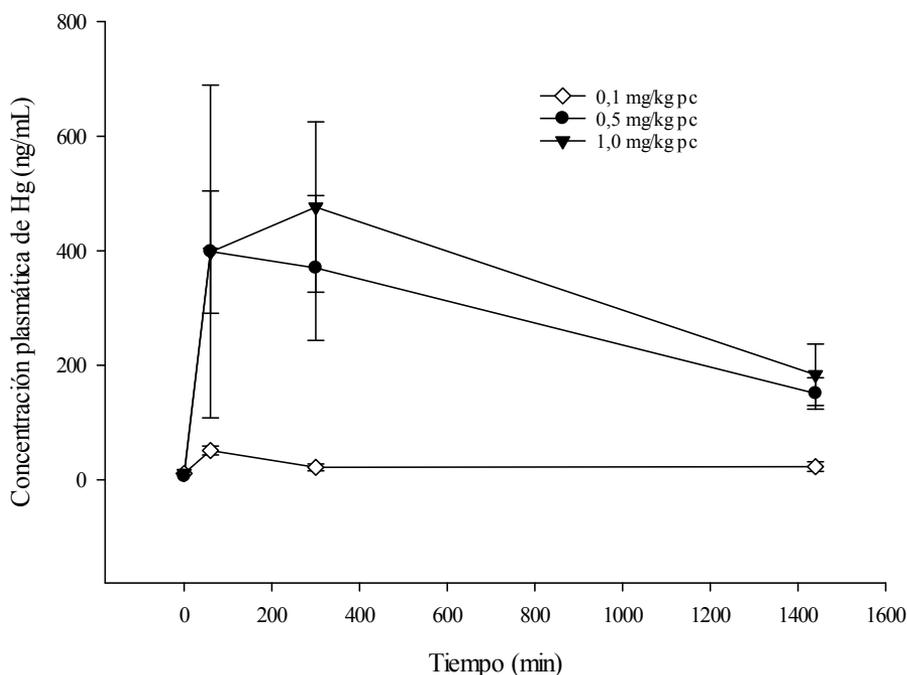


Figura 52. Concentración de Hg en plasma en función del tiempo en ratones expuestos a CH_3Hg . Valores expresados como ng Hg/mL (media \pm SD, n=5).

Los resultados obtenidos muestran que la llegada a plasma del Hg es detectable en todos los ensayos, exceptuando la concentración más baja de Hg(II) (0,1 mg/kg pc). Para el Hg(II) se observan diferencias importantes entre las dos concentraciones más elevadas. Para el CH_3Hg , la cantidad de Hg en plasma es muy inferior en los ratones dosificados con 0,1 mg/kg pc, mientras que en las otras dosis no existen diferencias estadísticamente significativas.

En todas las condiciones ensayadas, la concentración plasmática de Hg(II) es muy inferior a la obtenida para el CH_3Hg . Estos datos coinciden con los de otros autores que evidencian que la biodisponibilidad de la forma orgánica es mucho

mayor que la del Hg(II) (Sasser *et al.*, 1978; Walsh, 1982; Endo *et al.*, 2003). El área debajo de la curva (AUC) obtenida de las representaciones anteriores muestra claramente las variaciones de la exposición plasmática con la concentración y la mayor absorción de la forma orgánica de Hg [figura 53 para Hg(II) y figura 54 para CH₃Hg].

Los resultados muestran que para el Hg(II) existen diferencias entre las AUC de las dos concentraciones más elevadas mientras que para el CH₃Hg las concentraciones más elevadas presentan AUC similares y muy diferentes a las de los animales dosificados con 0,1 mg/kg pc. Atendiendo a estos resultados podemos concluir que se puede trabajar en el rango 0,5-1 mg/kg pc para Hg(II) y entre 0,1 y 1 mg/kg pc para CH₃Hg, sin que existan problemas de toxicidad detectables y obteniendo concentraciones de Hg en plasma cuantificables.

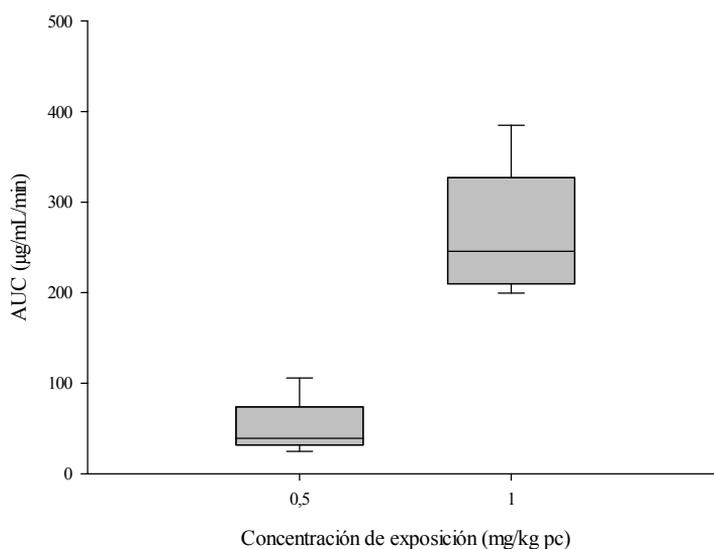


Figura 53. Valores del área debajo de la curva (AUC) en función de la concentración de Hg(II). Valores expresados como µg Hg/mL/min (media ± SD, n=5).

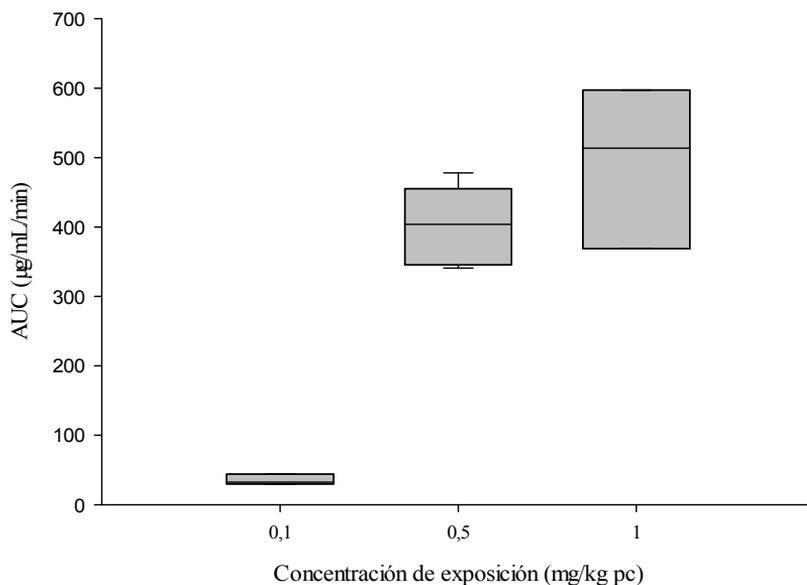


Figura 54. Valores del área debajo de la curva (AUC) en función de la concentración de CH_3Hg . Valores expresados como $\mu\text{g Hg/mL/min}$ (media \pm SD, $n=5$).

2. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA TOXICOCINÉTICA DE LAS DISOLUCIONES PATRÓN DE MERCURIO

2.1. Efecto de los componentes alimentarios sobre la biodisponibilidad

Los resultados de la dosificación de los animales con Hg(II) (1 mg/kg pc) o CH_3Hg (0,1 mg/kg pc) combinado con los tres componentes alimentarios seleccionados se muestran en las figuras 55 y 56 respectivamente. Los datos del AUC indican que los animales tratados con Cys (4 mmol/kg pc) presentan concentraciones menores de Hg en sangre para ambas formas mercuriales. Los tratamientos con ácido tánico y HPMC no suponen reducciones estadísticamente significativas de los niveles plasmáticos.

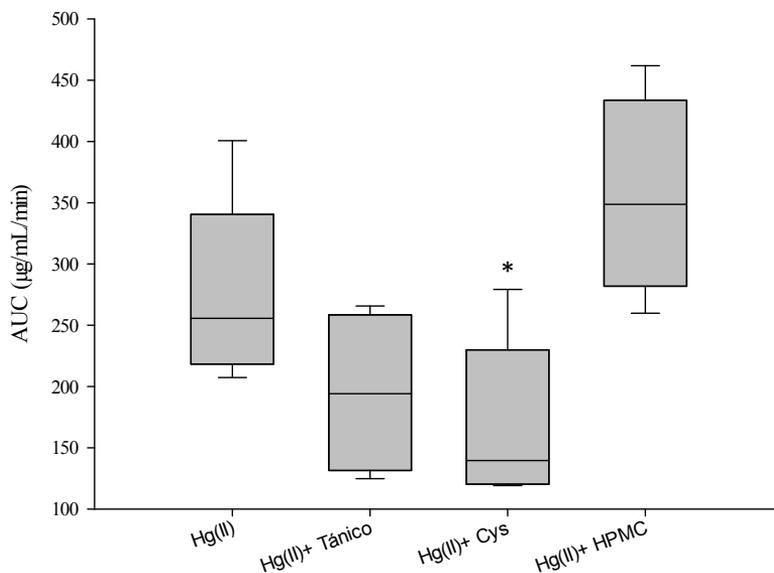


Figura 55. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con Hg(II) y componentes alimentarios. Datos obtenidos tras una única dosis de Hg(II) (1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como $\mu\text{g Hg/mL/min}$ (media \pm SD, $n=5$). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg(II) ($p < 0,05$).

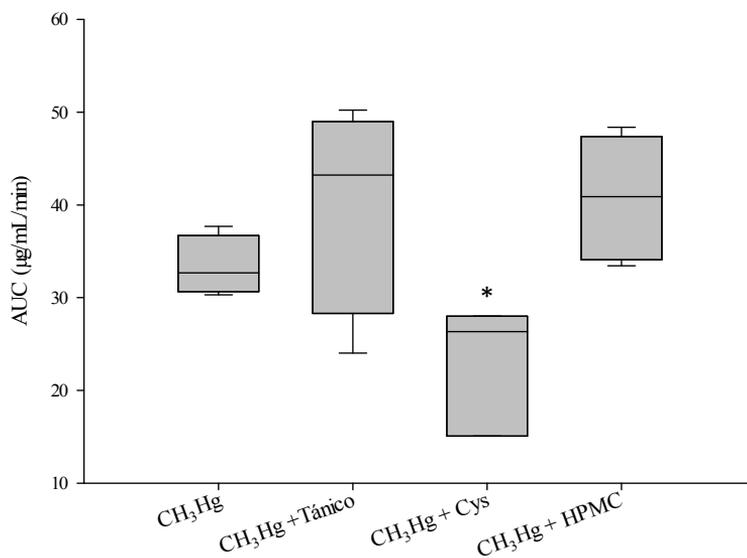


Figura 56. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con CH₃Hg y componentes alimentarios. Datos obtenidos tras una dosis única de CH₃Hg (0,1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como µg Hg/mL/min (media ± SD, n=5). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con CH₃Hg (p < 0,05).

Las biodisponibilidades relativas calculadas al comparar las áreas de las co-exposiciones con las de los controles tratados sólo con Hg se muestran en la tabla 23. Los tratamientos con Cys producen reducciones significativas de la biodisponibilidad tanto en los animales tratados con Hg(II) (mediana: 52%) como en los expuestos a CH₃Hg (mediana: 22%). El resto de tratamientos a las concentraciones y tiempos ensayados no son eficaces en la reducción de la biodisponibilidad.

	F% [Hg(II)]	F% (CH ₃ Hg)
Componentes alimentarios		
Ácido tánico	71 ± 25	121 ± 34
Cisteína	51 ± 10*	68 ± 19*
HPMC	129 ± 30	128 ± 18

Tabla 23. Biodisponibilidad relativa (F) del Hg(II) y CH₃Hg en animales co-expuestos a las formas mercuriales y componentes alimentarios. Valores expresados como porcentajes respecto a los animales tratados únicamente con las formas mercuriales y obtenidos mediante la aplicación de la ecuación 4 (media ± SD, n=5). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg ($p < 0,05$).

2.2. Efecto de los componentes alimentarios sobre la excreción fecal

La tabla 24 muestra la excreción fecal de ratones expuestos a Hg(II) y CH₃Hg en presencia o ausencia de los componentes alimentarios. Para el Hg(II) no se recogieron las heces 5 h tras la dosificación, por tanto, sólo se ha analizado la excreción 24 h tras la primera dosificación. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de los contenidos de Hg en las heces de los animales co-expuestos con HPMC. En los tratamientos con Cys y tánico se observan medianas superiores a los controles tratados sólo con Hg(II); sin embargo, debido a la variabilidad entre individuos no se obtiene diferencias estadísticamente significativas.

El efecto de los tratamientos con los componentes alimentarios sobre la excreción de CH₃Hg es más evidente, especialmente 5 h después de la dosificación. La magnitud de los incrementos de Hg en heces es especialmente notable con el

ácido tánico que aumenta la excreción hasta un 500% respecto a los animales tratados sólo con CH₃Hg.

	Tratamiento	Excreción fecal (5 h, ng/g)	Excreción fecal (24 h, ng/g)
Hg(II)	Sin componentes	n.a	1623-2159 (1735)
	Ácido tánico	n.a	1366-6310 (2389)
	Cisteína	n.a	1385-4017 (2935)
	HPMC	n.a	11901-29603* (20752)
CH ₃ Hg	Sin componente	26,2-68,1 (37,7)	79,5-167,1 (107,6)
	Ácido tánico	160,2-261,6* (202,4)	9,6-91,5 (54,9)
	Cisteína	37,6-71,7 (57,4)	70,8-163,0 (79,7)
	HPMC	62,1-317,2* (90,4)	81,5-93,1 (83,5)

Tabla 24. Excreción fecal en ratones expuestos a Hg y componentes alimentarios. Concentración de Hg en heces de animales tratados con Hg(II) (1 mg/kg pc) o CH₃Hg (0,1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios tras 5 y 24 horas de la primera dosificación. Valores expresados como ng Hg/g de heces (rangos y medianas en paréntesis, n=3-5). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg (p < 0,05); n.a, no analizado.

Los aumentos de la eliminación fecal observados para algunos tratamientos no se correlacionan con reducciones de la biodisponibilidad relativa (sección 2.1 del presente capítulo) y de la acumulación tisular (sección 2.3). Posiblemente este hecho sea debido a la elevada variabilidad interindividual que impide que se

obtengan datos concluyentes. Este hecho nos indica que es necesario emplear un mayor número de animales por condición.

2.3. Efecto de los componentes alimentarios sobre la acumulación tisular

La figura 57 (A, B y C) muestra la acumulación tisular en ratones tras 3 días de exposición a Hg(II) y CH₃Hg, en presencia o ausencia de los componentes alimentarios testados. Los animales tratados con Hg(II) han sido expuestos a dosis superiores (1 mg/kg pc) que los animales tratados con CH₃Hg (0,1 mg/kg pc), sin embargo esto no se evidencia en la acumulación en hígado (figura 57A) y cerebro (figura 57C). Únicamente se observa una mayor concentración de Hg en el riñón de los animales tratados con Hg(II) respecto a los tratados con CH₃Hg (13 veces) (figura 57B). En general, los animales tratados con la forma orgánica presentan una menor variabilidad interindividual, hecho que puede ser debido a que a una menor dosificación no se producen fenómenos de saturación y/o toxicidad.

La variabilidad existente en los animales tratados con Hg(II) dificulta el análisis estadístico, no observándose diferencias entre tratamientos en la mayoría de los casos. Así, la mediana de acumulación hepática del tratamiento con Hg(II) (3,1 µg/g) es muy superior a la de las co-exposiciones con ácido tánico (1,4 µg/g) y Cys (1,4 µg/g), si bien las diferencias no son significativas (figura 57A). Del mismo modo, la acumulación renal de los animales tratados sólo con Hg(II) (34,6 µg/g) es más elevada que los tratamientos en presencia de los componentes alimentarios (ácido tánico: 26,5 µg/g; Cys: 20,5 µg/g; HPMC: 16,8 µg/g), no existiendo tampoco diferencias estadísticamente significativas (figura 57B). Sólo se evidencia una reducción estadísticamente significativa en el cerebro de ratones tratados con Cys (66-75%, mediana: 67%) (figura 57C).

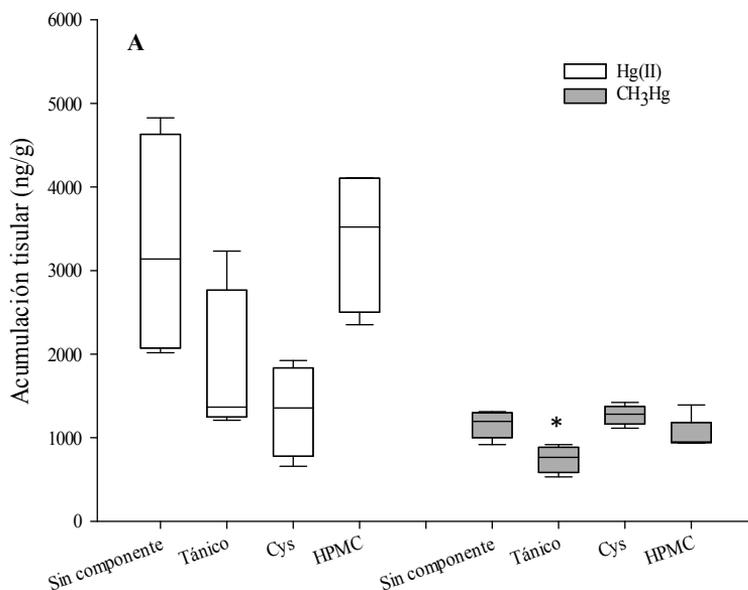


Figura 57. Acumulación tisular en ratones expuestos a Hg(II) o CH₃Hg y componentes alimentarios. Concentración de Hg en hígado (57A), riñones (57B) y cerebro (57C) de animales tratados con Hg(II) (1,0 mg/kg pc) o CH₃Hg (0,1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como ng Hg/g (media ± SD, n=5). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg ($p < 0,05$).

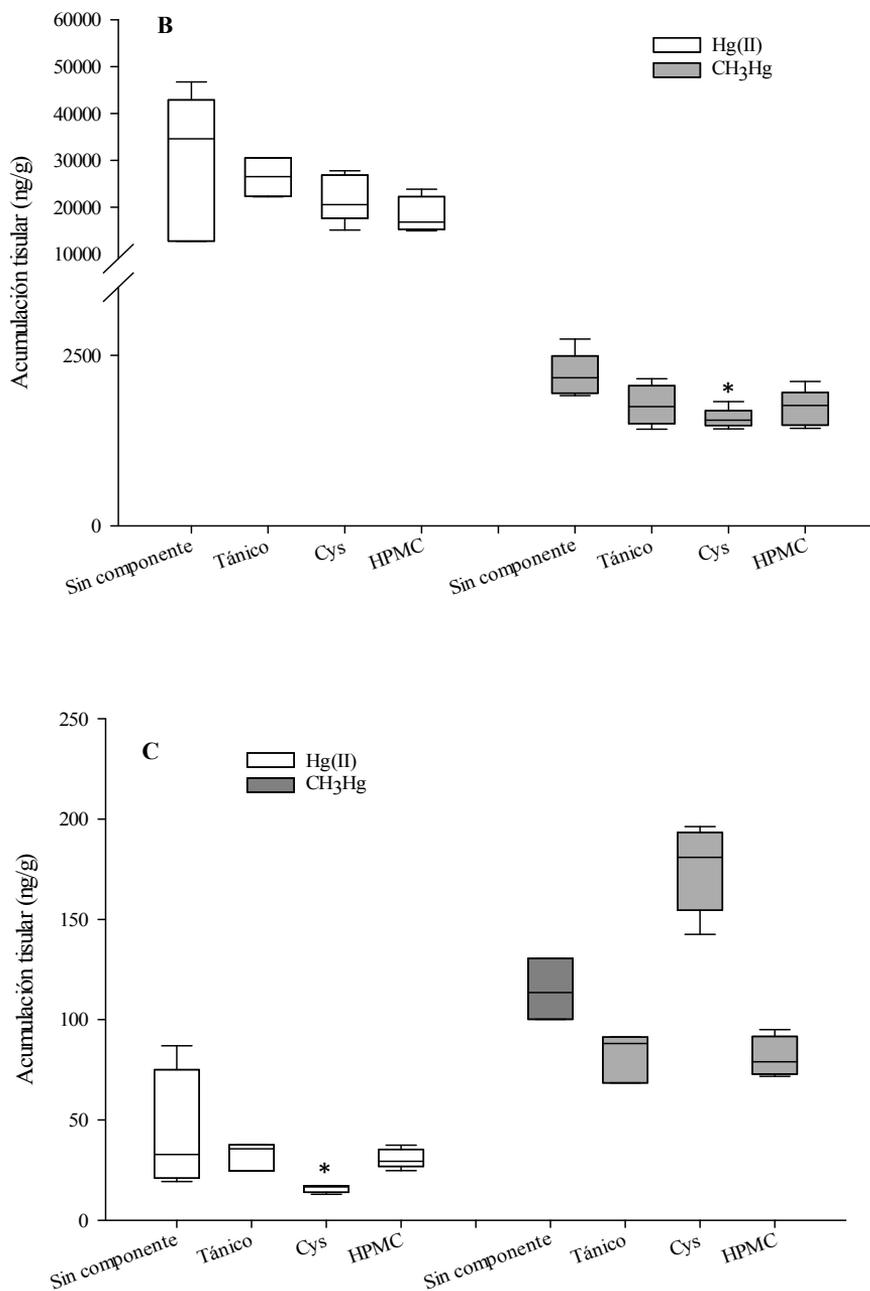


Figura 57. Continuación.

Para los animales tratados con CH_3Hg , las diferencias entre las medianas de acumulación en órganos de los distintos tratamientos son menores; sin embargo, sí se evidencian diferencias estadísticamente significativas para algunos tratamientos. Hay una reducción del contenido de Hg en hígado (21-54%, mediana: 34%) en animales tratados con tánico/ CH_3Hg (mediana: 0,76 $\mu\text{g/g}$) con respecto a los expuestos únicamente con CH_3Hg (mediana: 1,20 $\mu\text{g/g}$) (figura 57A). También se observa una disminución significativa de la acumulación renal (18-36%; mediana: 30%) en los tratamientos con Cys (mediana Cys/ CH_3Hg : 1,55 $\mu\text{g/g}$; mediana CH_3Hg : 2,17 $\mu\text{g/g}$) (figura 57B). Asimismo, hay que indicar que el tratamiento con Cys supone un aumento de la concentración de Hg en el cerebro (mediana: 175 ng/g) respecto a los animales tratados sólo con la forma orgánica de Hg (mediana: 115 ng/g) (figura 57C).

3. EFECTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA TOXICOCINÉTICA DE DISOLUCIONES PATRÓN DE MERCURIO

3.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la biodisponibilidad

Teniendo en cuenta la alta variabilidad interindividual de los parámetros evaluados en los estudios con componentes alimentarios, los ensayos con bacterias lácticas se llevaron a cabo aumentando el número de animales por condición ($n=7$). Las AUC de los animales tratados con Hg(II) y CH_3Hg en presencia o ausencia de las bacterias lácticas se muestran en las figuras 58 y 59 respectivamente. Los tratamientos con bacterias lácticas no afectan la llegada de Hg(II) a plasma, pero reducen significativamente la llegada de CH_3Hg .

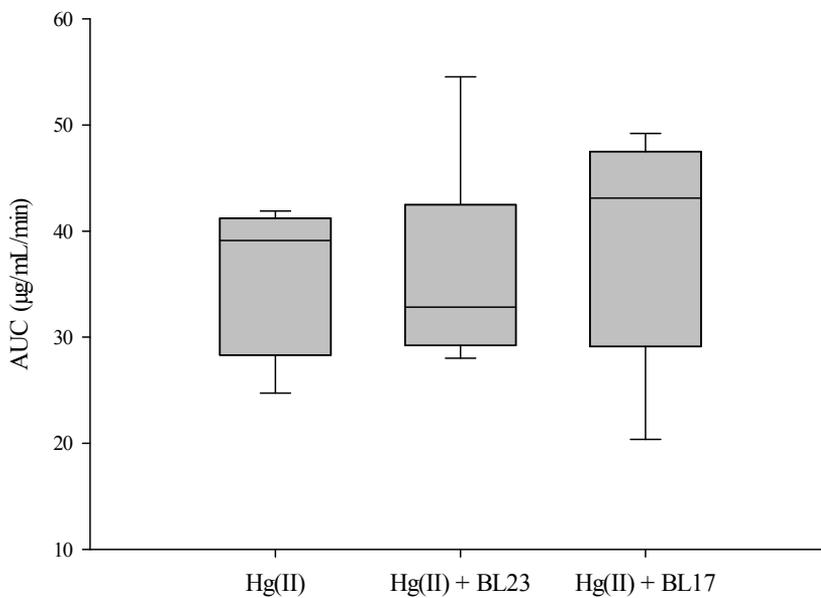


Figura 58. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con Hg(II) y bacterias lácticas. Datos obtenidos tras una dosis única de Hg(II) (0,5 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de bacterias lácticas. Valores expresados como $\mu\text{g Hg/mL/min}$ (media \pm SD, n=7).

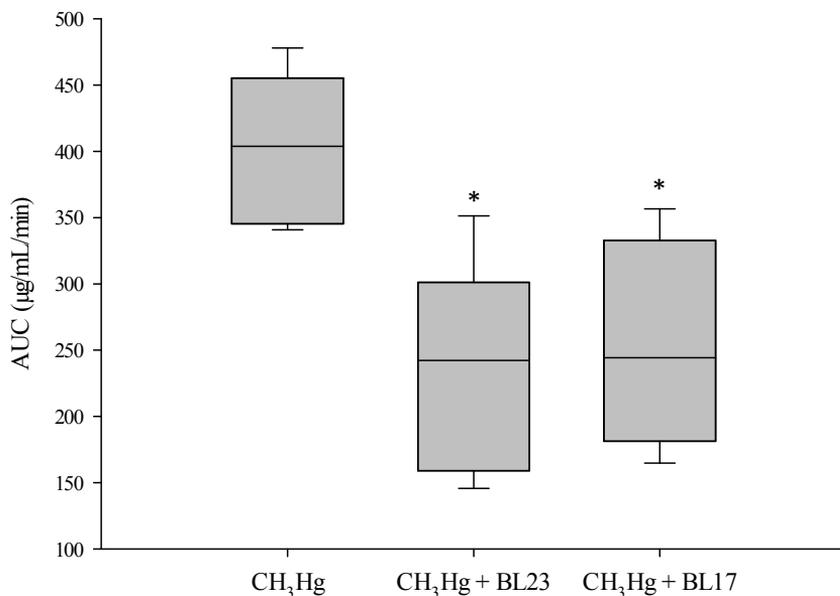


Figura 59. Valores del área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con CH₃Hg y bacterias lácticas. Datos obtenidos tras una dosis única de CH₃Hg (0,5 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de bacterias lácticas. Valores expresados como µg Hg/mL/min (media ± SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con CH₃Hg (p < 0,05).

Las biodisponibilidades relativas de la forma orgánica (tabla 25) oscilan entre 36-75% para BL23 y entre 41-81% para BL17. En las condiciones ensayadas, las bacterias son más eficaces reduciendo la biodisponibilidad de CH₃Hg que los componentes alimentarios; sin embargo, la Cys es más eficaz disminuyendo la biodisponibilidad del Hg(II) que las dos cepas de bacterias lácticas.

	F% [Hg(II)]	F% (CH ₃ Hg)
Componentes alimentarios		
BL23	89 ± 11	61 ± 14*
BL17	108 ± 11	58 ± 17*

Tabla 25. Biodisponibilidad relativa (F) del Hg(II) y CH₃Hg en animales co-expuestos a las formas mercuriales y bacterias lácticas. Valores expresados como porcentajes respecto a los animales tratados únicamente con las formas mercuriales y obtenidos mediante la aplicación de la ecuación 4 (media ± SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg (p < 0,05).

3.2. Efecto de las bacterias lácticas sobre la excreción fecal

Las figuras 60 y 61 muestran la excreción fecal de los ratones expuestos a Hg(II) y CH₃Hg respectivamente. Los datos evidencian que el pretratamiento con bacterias lácticas y la posterior co-exposición de los animales con Hg(II) y bacterias no influye sobre la excreción de Hg inorgánico, a excepción del tratamiento con BL17 el primer día de exposición, donde se observa un aumento de la excreción fecal (16-270%) respecto a la excreción observada en los animales tratados sólo con Hg(II). Este aumento, sin embargo, no se refleja en la concentración plasmática de los animales, que no presenta diferencias entre el grupo tratado con esta cepa y el tratado únicamente con Hg(II) (tabla 25).

En el caso de CH₃Hg la situación es diferente ya que para ambas bacterias se observa un aumento estadísticamente significativo de la eliminación fecal el tercer día de exposición. La cepa BL17 genera un aumento respecto a los animales sólo tratados con Hg que oscila entre 38 y 106% (mediana: 72%), similar al resultante del tratamiento con la cepa BL23 (rango: 13-124%, mediana: 68%).

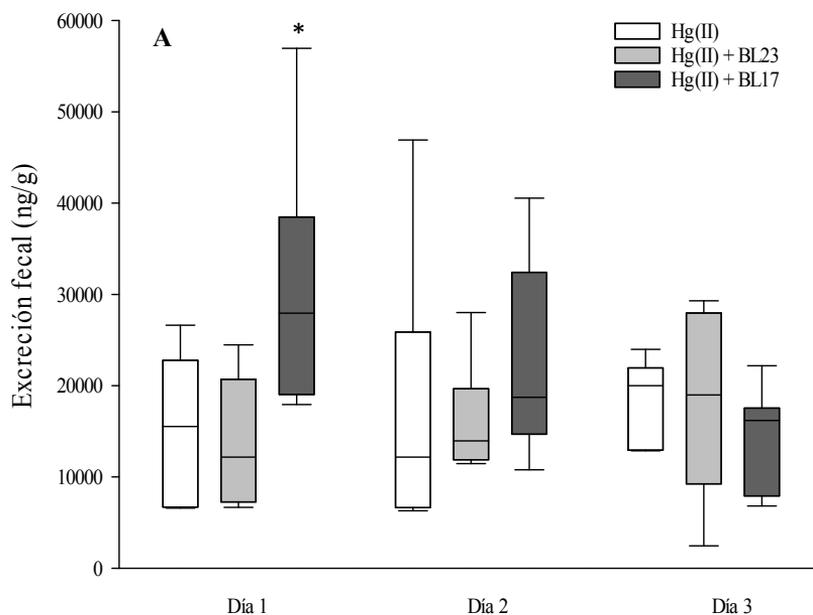


Figura 60. Excreción fecal en ratones expuestos a Hg y bacterias lácticas. Concentración de Hg en heces de animales tratados con Hg(II) (0,5 mg/kg pc) (60A) o CH₃Hg (0,5 mg/kg pc) (60B) por sonda gástrica en ausencia o presencia de bacterias lácticas. Valores expresados como ng Hg/g de heces (media ± SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg (p < 0,05).

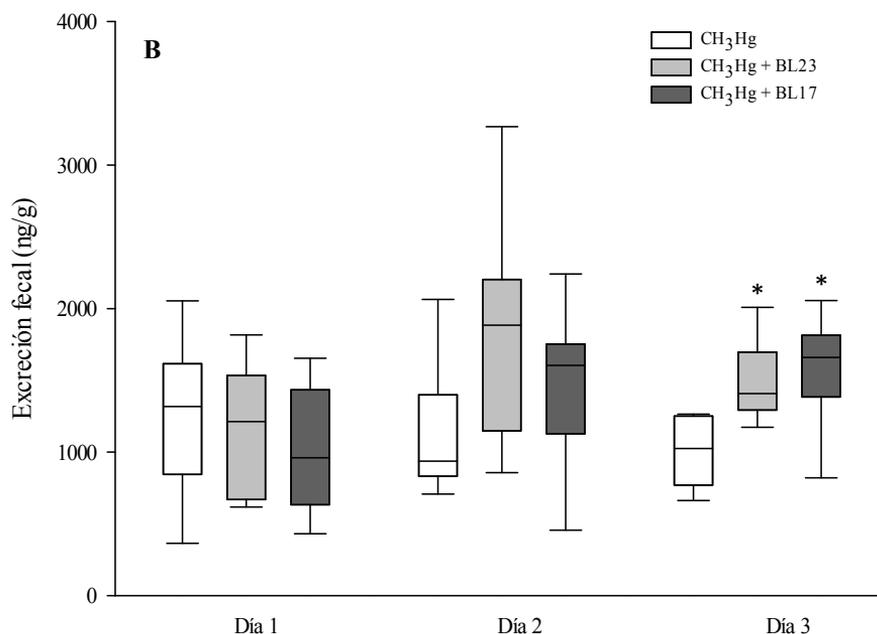


Figura 60. Continuación.

3.3. Efecto de las bacterias lácticas sobre la acumulación tisular

La figura 61 muestra la acumulación tisular en hígado (61A), riñón (61B), intestino (61C) y cerebro (61D) de los ratones expuestos durante 2 días consecutivos a una dosis diaria de Hg(II) o CH₃Hg (0,5 mg/kg pc) en ausencia o presencia de bacterias lácticas. En este segundo ensayo es posible comparar las acumulaciones tisulares de los animales tratados con las dos especies de Hg, ya que, a diferencia del ensayo con componentes alimentarios, la dosis de exposición ha sido la misma para ambas formas químicas. Teniendo en cuenta la diferencia en los niveles plasmáticos y en la excreción fecal entre las dos formas de Hg, es de esperar que la acumulación tisular sea mucho mayor para el CH₃Hg. Esto es así para el hígado, intestino y

cerebro; sin embargo, en riñón, la acumulación de ambas formas no presenta diferencias estadísticamente significativas. Tras 3 días de dosificación con CH₃Hg la mediana de la acumulación tisular sigue la siguiente gradación: riñón (3895 ng/g), hígado (2534 ng/g), intestino (663 ng/g) y cerebro (271 ng/g). En los animales expuestos a Hg(II), la acumulación sigue el mismo orden: riñón (2364 ng/g), hígado (250 ng/g), intestino (108 ng/g) y cerebro (8 ng/g).

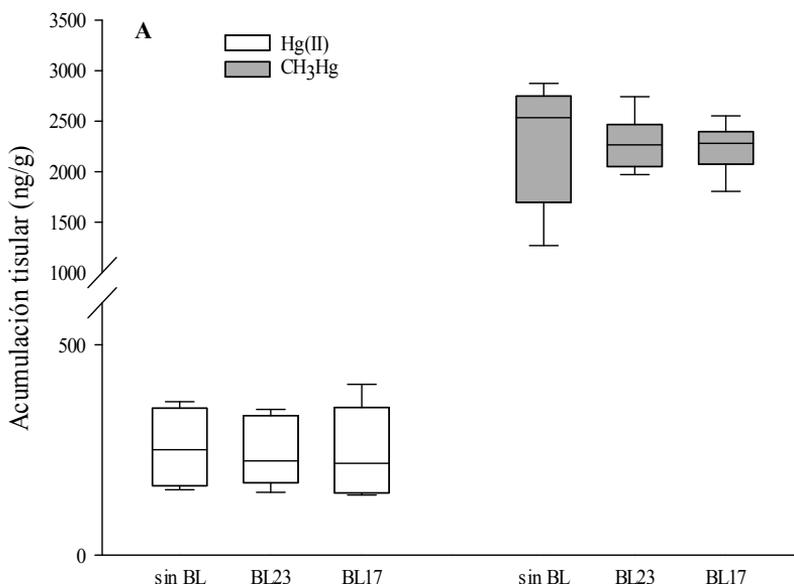


Figura 61. Acumulación tisular en ratones expuestos a Hg(II) o CH₃Hg y bacterias lácticas. Concentración de Hg en hígado (61A), riñones (61B), intestino (61C) y cerebro (61D) de animales tratados con Hg(II) (0,5 mg/kg pc) o CH₃Hg (0,5 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de bacterias lácticas. Valores expresados como ng Hg/g (media ± SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo con Hg ($p < 0,05$).

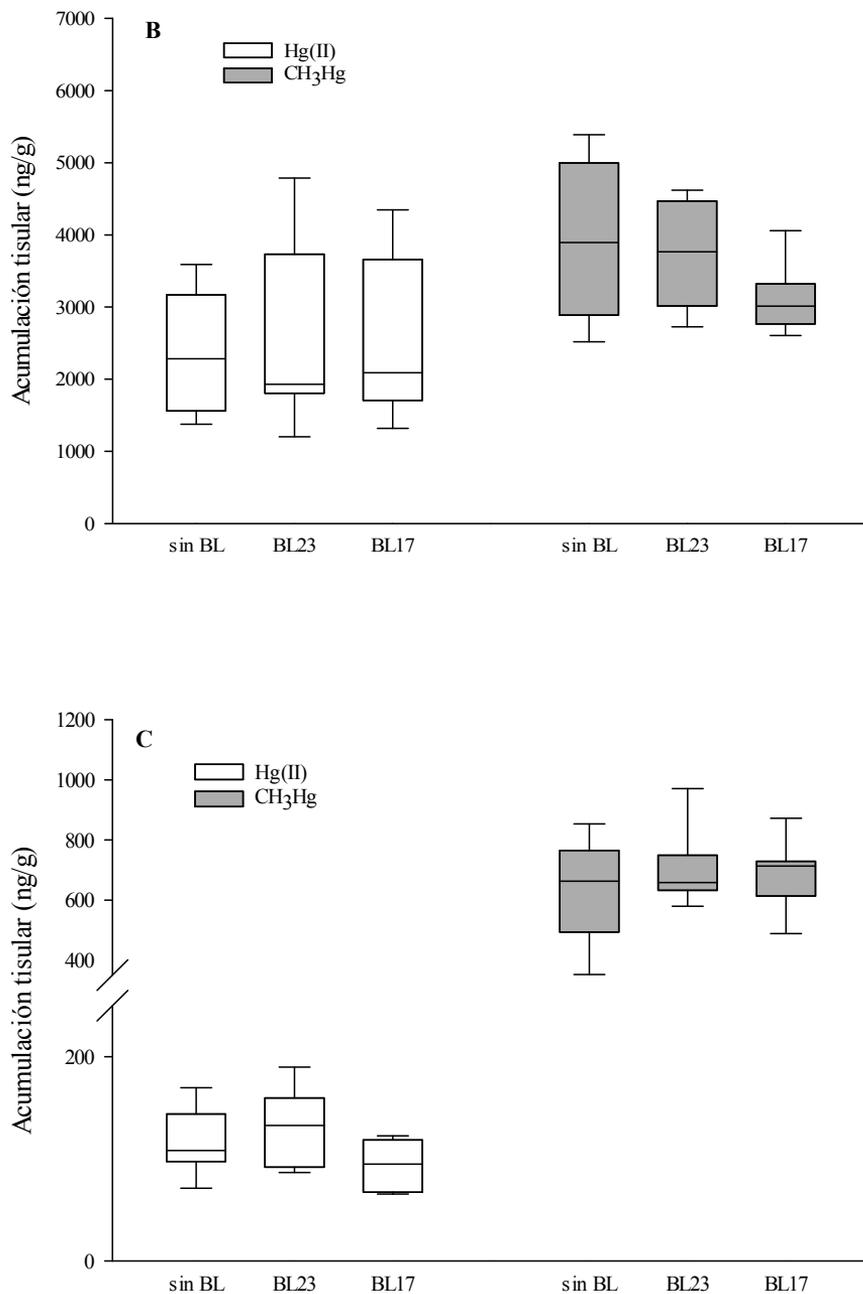


Figura 61. Continuación.

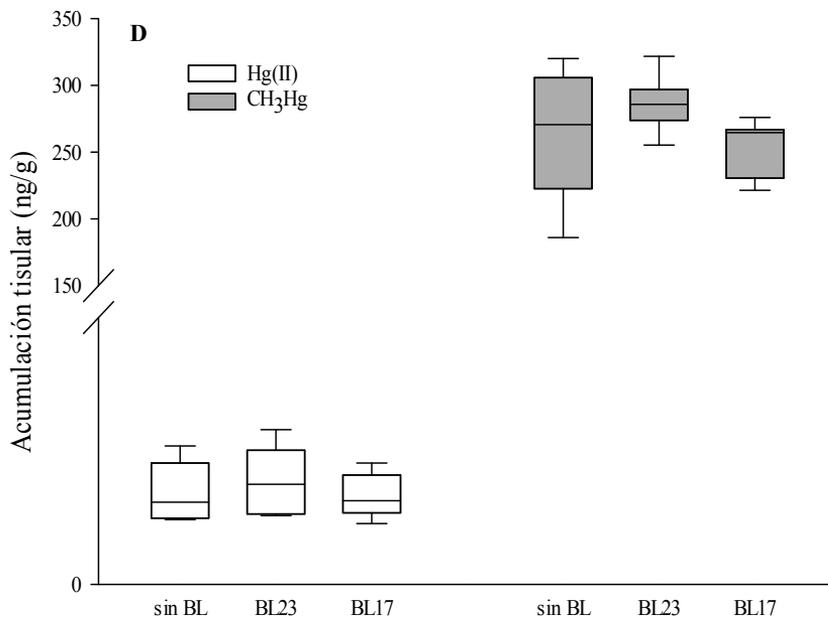


Figura 61. Continuación.

La comparación de las medias de acumulación en órganos de los animales tratados con las especies mercuriales con respecto a los pretratados con bacterias lácticas y posteriormente co-expuestos a bacterias lácticas/formas mercuriales no arroja diferencias estadísticamente significativas. A diferencia de lo que ocurría en el ensayo con componentes alimentarios, en este caso no existen diferencias tan notables entre las medianas de los animales expuestos sólo a las formas mercuriales y los tratados con las bacterias lácticas.

DISCUSIÓN

La finalidad de la búsqueda de estrategias dietarias es su aplicación especialmente en poblaciones donde existe una exposición continuada a Hg. Tal y como se indica en la introducción (sección 6), los estudios sobre biomarcadores de exposición muestran que en determinadas zonas del planeta existen poblaciones altamente expuestas debido a la actividad minera que contamina agua y alimentos o por un consumo elevado de productos pesqueros. Por ello, los resultados favorables obtenidos *in vitro* tienen que confirmarse *in vivo* constituyendo una etapa obligatoria en el desarrollo de estrategias viables. El empleo de roedores en los estudios de biodisponibilidad y acumulación es una práctica muy habitual cuando se evalúan nutrientes y tóxicos alimentarios. Existen estudios, sin embargo, que indican que los roedores pueden no ser el modelo más idóneo para la evaluación de la toxicocinética de metales. Weis y Lavelle (1991) apuntan como uno de los principales problemas los hábitos alimentarios de los roedores, tales como la coprofagia, su forma continuada de comer que evita el vaciado estomacal y la presencia de una microflora estomacal que digiere celulosa y otro tipo de materiales no digeribles por el hombre. Este modelo animal, sin embargo, ha sido el más empleado en los estudios con Hg, los cuales muestran en numerosas ocasiones una buena correlación con lo que ocurre en humanos. Así, los estudios en roedores revelan que la forma inorgánica se absorbe con una menor eficacia que la forma orgánica (Sasser *et al.*, 1978; Piotrowski *et al.*, 1992) y esta misma tendencia se observa en humanos (Smith y Farris, 1996). Los resultados obtenidos en el presente capítulo en los animales expuestos únicamente a Hg(II) y CH₃Hg coinciden con los descritos previamente en bibliografía. La forma orgánica se absorbe en mayor medida que la inorgánica, la cual se elimina mayoritariamente por heces, siendo los órganos con mayor acumulación el hígado y los riñones.

Los ensayos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los capítulos 2 y 3 respectivamente han evidenciado que los compuestos y bacterias seleccionadas para el ensayo con roedores producen una importante reducción del Hg que podría llegar a la circulación sistémica, independientemente de la forma mercurial analizada. Era por tanto esperable observar en los animales tratados con estas estrategias una reducción de la biodisponibilidad de Hg, acompañada de un aumento de la excreción fecal y una concentración menor de Hg en los órganos diana (hígado, riñón e intestino). Sin embargo, esta situación no se evidencia para la mayoría de tratamientos ensayados.

Los resultados obtenidos tras la co-exposición con los componentes alimentarios muestran a la Cys y el ácido tánico como las estrategias más prometedoras. La Cys produce una elevada reducción de la biodisponibilidad de ambas formas mercuriales y un aumento de su excreción fecal. Se observa también, una reducción de la acumulación renal en animales tratados con CH₃Hg y un descenso del contenido de Hg en el cerebro de roedores dosificados con Hg(II). Además, los contenidos medios de Hg en el resto de tejidos son inferiores a los de los animales tratados con Hg, si bien no existen diferencias estadísticamente significativas. Se produce sin embargo, un aumento del contenido de Hg en cerebro de animales co-expuestos a Cys y CH₃Hg que hace dudar sobre la posible aplicación de esta estrategia. Roos *et al.* (2010) muestran un efecto similar en ratones co-expuestos durante 60 días a CH₃Hg y Cys mediante una administración intraperitoneal. Los autores evidencian un incremento en la acumulación de Hg en cerebro e hígado y una disminución en el contenido renal. Estos autores justifican este efecto indicando que el transporte del complejo formado por CH₃Hg-Cys puede verse favorecido en determinados órganos. Este hecho debe comprobarse previamente a cualquier otra modificación del protocolo de dosificación, empleando un mayor número de animales por condición. Aunque el aumento

observado está en el orden de ng/g, no deja de ser relevante, mas si tenemos en cuenta que el sistema nervioso es el principal órgano diana para el metilmercurio.

El ácido tánico, aunque no reduce significativamente la biodisponibilidad, incrementa la excreción fecal y reduce la acumulación hepática y cerebral de animales tratados con CH₃Hg. Además, al igual que ocurre con la Cys, los contenidos medios de la mayoría de tejidos son menores que los de los animales tratados únicamente con Hg, si bien el análisis estadístico no muestra variaciones significativas. Además, el tratamiento con ácido tánico no muestra un incremento del contenido del metal en ningún tejido. La eficacia del ácido tánico en la reducción de la acumulación tisular en roedores se ha puesto de manifiesto para otros metales, aunque en la mayoría de casos se emplean concentraciones de ácido tánico superiores a las testadas en este capítulo y tiempos de exposición más prolongados. Así, Winiarska-Mieczan *et al.* (2013) muestran un menor contenido de Cd y Pb en pulmones y corazón de ratas tratadas diariamente con 2% de ácido tánico conjuntamente con Cd (0,5 mg/kg pc) o Pb (3 mg/kg pc) durante un periodo de 6 a 12 semanas a través del agua de bebida. Tomaszewska *et al.* (2017) evidencian que la eficacia de este polifenol en la reducción de la acumulación ósea de Cd depende de la dosis administrada, de hecho, no se observa a concentraciones inferiores al 1,5%. La dosis empleada en el presente capítulo es de 0,39%, inferior a las dosis empleadas en otros estudios. Estos datos apuntan a que posiblemente se requieran mayores concentraciones de este tanino para observar efectos significativos sobre la biodisponibilidad, excreción y acumulación de Hg(II) y CH₃Hg.

El tratamiento con bacterias lácticas también evidencia resultados positivos, al disminuir la biodisponibilidad y aumentar la excreción fecal de CH₃Hg. Aunque las reducciones de la biodisponibilidad son importantes, este hecho no se refleja en los contenidos de Hg en los órganos evaluados. Por otro lado, a la concentración de bacterias empleada en el presente capítulo (1×10^9 UFC/mL) no existen efectos

significativos sobre la toxicocinética del Hg(II). Recientemente Majlesi *et al.* (2017) han mostrado que la dosificación de Hg(II) con *Lactobacillus plantarum* y esporas de *Bacillus coagulans* (1×10^9 UFC/mL) reduce significativamente la acumulación de esta forma mercurial en hígado y riñón tras 24 o 48 días de tratamiento. Esta diferencia con nuestros resultados puede deberse a la cepa bacteriana, en nuestro estudio se emplean cepas de *L. casei* y *L. acidophilus*, o al periodo de tratamiento, mucho más elevado que el ensayado en el presente capítulo. Respecto al tiempo de exposición, no existen ensayos que evalúen la modulación de la toxicocinética de Hg por parte de las bacterias lácticas en exposiciones agudas; sin embargo, si se ha evidenciado la eficacia de *L. plantarum* en exposiciones agudas a Cd (2 días, 1.8 mg) (Zhai *et al.*, 2013). Estos autores demuestran que la pre-exposición de los animales con las bacterias (1×10^9 UFC/mL durante 7 días), reduce significativamente la acumulación hepática y renal y aumenta la eliminación fecal de Cd administrado en disolución salina. En cuanto a las cepas bacterianas empleadas para reducir la absorción y acumulación de metales se ha constatado la eficacia de *L. plantarum* (Zhai *et al.*, 2013, 2015; Majlesi *et al.*, 2017), *Leuconsotoc mesenteroides* (Yi *et al.*, 2017) y *B. coagulans* (Majlesi *et al.*, 2017). No existen, sin embargo, estudios donde se empleen las cepas ensayadas en este capítulo. Por otro lado, Zhai *et al.* (2013) muestran que cepas que han sido eficaces reduciendo la solubilidad de Cd *in vitro* no son finalmente capaces de modificar la toxicocinética del metal cuando se trabaja con animales de experimentación. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, es necesario llevar a cabo más ensayos donde se modifique la forma de exposición y posiblemente donde se evalúe la eficacia de otras cepas bacterianas, aquellas que en el capítulo 3 habían producido una importante reducción de la bioaccesibilidad de Hg desde patrones acuosos. Asimismo, deben ensayarse *in vivo* cepas de levaduras, dado que también han mostrado esta eficacia *in vitro*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian las posibilidades que presentan la Cys, el ácido tánico y las cepas bacterianas como estrategias para la disminución de la exposición a Hg. Sin embargo, este estudio no es concluyente y se necesitan más ensayos donde se modifiquen variables tales como la concentración y el tiempo de exposición, para poder afirmar que estamos ante estrategias dietarias eficaces. Además, se requieren nuevos ensayos con otros componentes como el GSH, otras cepas bacterianas y levaduras cuya capacidad para quelar el Hg durante la digestión o evitar su transporte celular han sido confirmados en los capítulos anteriores. Incluso se puede plantear el uso de combinaciones de estrategias para que aumente la eficacia del tratamiento. Esto permitirá tener finalmente un mayor abanico de posibilidades para poder proponer vías de reducción de la exposición oral a Hg.

Por otro lado, no hay que olvidar que los estudios *in vivo* sólo se han llevado a cabo dosificando patrones acuosos, pero los principales contribuidores dietarios a Hg son los alimentos y, por tanto, hay que encontrar también aquellas estrategias eficaces reduciendo la absorción y acumulación del Hg ingerido con los alimentos. Los datos procedentes de los capítulos anteriores han puesto de manifiesto que es necesario investigar esta forma de dosificación, ya que no siempre se pueden extrapolar los datos obtenidos con disoluciones acuosas.

Finalmente hay que indicar que el uso de los componentes de la dieta o de los microorganismos ensayados en este capítulo se considera una estrategia viable, ya que en la mayoría de los casos existen suplementos dietéticos o extractos vegetales en el mercado con un elevado contenido de los mismos (capítulo 4) o existen preparados lácteos que contienen los microorganismos ensayados, los cuales pueden tomarse de forma continuada sin que esto suponga un problema para el consumidor. Este es, sin duda, el objetivo final, la aplicación de estos productos presentes en el

mercado cuya seguridad está testada. La eficacia de estos suplementos o extractos también debe ser comprobado, ya que presentan una composición muy diferente a la de los compuestos puros, hecho que posiblemente podrían afectar a su interacción con las formas mercuriales.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en la presente tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones para cada uno de los objetivos parciales planteados

1. Caracterización de la fracción bioaccesible de alimentos

- La estimación del riesgo asociado a la ingesta de Hg a través de los alimentos varía al considerar la bioaccesibilidad en lugar de los contenidos en el producto y también al incluir el aporte de Se en la evaluación. Considerando estos parámetros se ha evidenciado que algunas de las muestras que superan los límites legislados y cuyo consumo excede la IST podrían presentar un riesgo asociado menor, ya que la fracción bioaccesible de Hg es reducida y el ratio molar Se/Hg es mayor a la unidad.

- La bioaccesibilidad de Hg se reduce a pHs mayores a 2, hecho que puede indicar que determinados grupos poblacionales, en concreto niños pequeños y mujeres embarazadas, vean reducida la entrada de este elemento tóxico al torrente sanguíneo. Son necesarios estudios *in vivo* para confirmar esta hipótesis, de gran relevancia si se tiene en cuenta que estos son los grupos más vulnerables al efecto tóxico del Hg.

- La digestión gastrointestinal no modifica la forma química del Hg.

2. Búsqueda de componentes alimentarios o cepas de *Lactobacillus* o *S. cerevisiae* que reduzcan la bioaccesibilidad de Hg

- 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 entrada de Hg a la circulación sistémica. La acción de estos compuestos se debe posiblemente a la formación de complejos de reducida solubilidad con el Hg.

- Estos componentes de la dieta no modifican la forma química del Hg durante el proceso digestivo, sin embargo, reducen la bioaccesibilidad de algunos elementos

esenciales. Es necesario evaluar *in vivo* si este hecho supone una reducción de los niveles sistémicos de estos minerales, hecho que descartaría el uso de estos compuestos como posibles estrategias para reducir la exposición oral a Hg.

- Determinadas cepas de bacterias lácticas y levaduras *S. cerevisiae* son capaces de captar Hg(II) y CH₃Hg en las condiciones existentes en una digestión gastrointestinal, posibilitando su utilización como estrategias para evitar la absorción de este metal cuando se ingiera con agua y alimentos. La captación del Hg se debe principalmente a mecanismos de adsorción superficial.

- Estos microorganismos de grado alimentario no son eficaces en la reducción de la bioaccesibilidad del Hg presente en productos pesqueros. Este hecho puede deberse principalmente a la aparición de complejos de Hg-Cys o Hg-polipéptidos en el digerido que no sean fácilmente captados por las bacterias y levaduras.

- Las bacterias y levaduras empleadas, a diferencia de lo que ocurre con los componentes alimentarios, no afectan de forma destacable la bioaccesibilidad de los elementos esenciales evaluados. Tampoco modifican la forma química del Hg.

3. Búsqueda de componentes alimentarios o cepas de *Lactobacillus* o *S. cerevisiae* que reduzcan *in vitro* el transporte de Hg a través del epitelio intestinal

- Compuestos con grupos tiol (cisteína o GSH), flavonoides como la quercetina, polifenoles como el ácido tánico o extractos vegetales y suplementos ricos en los mismos puede ser una estrategia adecuada para reducir la biodisponibilidad oral de Hg, ya que todos estos compuestos reducen de forma significativa el transporte *in vitro* de Hg en disolución acuosa o del Hg presente en la fracción bioaccesible de productos pesqueros.

- Este efecto posiblemente es debido a la formación de complejos con el Hg cuyo transporte sea menor que el de las formas salinas del metal o a que estos compuestos

compitan por los mismos mecanismos de internalización celular que las formas mercuriales.

- Las bacterias lácticas y las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas también reducen el transporte de las especies químicas de Hg en disolución acuosa, posiblemente por su capacidad de captación de las mismas.

- Las bacterias y levaduras también son capaces de reducir el transporte del Hg presente en la fracción bioaccesible de pez espada. El efecto puede deberse a una modulación de las uniones intercelulares que conlleve una reducción de la permeabilidad del Hg, ya que en presencia de estos microorganismos se evidencia un aumento de la resistencia eléctrica transepitelial de la monocapa celular.

4. Confirmación *in vivo* de la eficacia de las estrategias exitosas *in vitro*

- Los resultados obtenidos en roedores evidencian las posibilidades que presentan la cisteína y el ácido tánico como agentes reductores de la exposición a Hg. Sin embargo, este estudio no es concluyente, ya que se requiere un mayor número de individuos para que las variaciones observadas muestren una significación estadística. Además, debe confirmarse que la cisteína no aumente la acumulación de CH₃Hg en el cerebro, hecho que impediría su aplicación en poblaciones expuestas.

- Las dos cepas de bacterias lácticas ensayadas reducen la biodisponibilidad y aumentan la excreción fecal de CH₃Hg; sin embargo, no afectan la toxicocinética del Hg(II). Es necesario evaluar la eficacia de otras cepas de *Lactobacillus* e iniciar los estudios con cepas de *S. cerevisiae* para obtener estrategias en base a estos microorganismos útiles para la reducción de ambas especies mercuriales.

- Adicionalmente son necesarios estudios donde se evalúen *in vivo* la eficacia de estas estrategias cuando el Hg se ingiere con un alimento.

Bibliografia

- AECOSAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Nutrición y Consumo) (2011). Recomendaciones de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición para poblaciones sensibles: mujeres embarazadas o en periodo de lactancia y población infantil. Disponible en: http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/docs/docs/rincon_consumidor/Recomendaciones_mercurio.pdf.
- Afsana, K., Shiga, K., Ishizuka, S., Hara, H. (2004). Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 584-592.
- Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, 75-81.
- Aizpurúa, I.C.M., Tenuta-Filho, A., Sakuma, A.M., Zenebon, O. (1997). Use of cysteine to remove mercury from shark muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32, 333-337.
- Alcántara C., Jadán-Piedra C., Vélez D., Devesa V., Zúñiga M., Monedero V. (2017). Characterization of the binding capacity of mercurial species in *Lactobacillus* strains. *J. Sci. Food Agric.* doi: 10.1002/jsfa.8388.
- Al-Enazi, M.M., El-Bahrawy, A.Z., El-Khateeb, M.A. (2012). In vivo evaluation of the proteins in the cultivated mushrooms. *J. Nutr. Food Sci.* 2, 176.
- Amin-Zaki, L., Elhassani, S., Majeed, M.A., Clarkson, T.W., Doherty, R.A., Greenwood, M. (1974). Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics* 54, 587-595.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002584.
- Andrade, R.G.Jr., Dalvi, L.T., Silva, J.M.Jr., Lopes, G.K., Alonso, A., Hermes-Lima, M. (2005). The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 437, 1-9.

- Ansari, M.I., Masood, F., Malik, A. (2011). Bacterial biosorption: A technique for remediation of heavy metals. En *Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications*. Ahmad, L., Ahmad, F., Pichtel, J. (eds.), Springer Science+Business media, New York. pp. 283-319.
- Artursson, P., Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 880-885.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 27-43.
- Ayensu, W.K., Tchounwou, P.B. (2006). Microarray analysis of mercury-induced changes in gene expression in human liver carcinoma (HepG2) cells: importance in immune responses. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 3, 141-173.
- Bakkaloglu, I., Butter, T.J., Evison, L.M., Holland, F.S., Hancock, I.C. (1998). Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. *Water Sci. Technol.* 38, 269-277.
- Ball, L.K., Ball, R., Pratt, R.D. (2001). An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics* 107, 1147-1154.
- Ballatori, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ. Health Perspect.* 110, 689-694.
- Ballatori, N., Clarkson, T.W. (1985). Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5, 816-831.
- Bannon, D.I., Portnoy, M.E., Olivi, L., Lees, P.S.J., Culotta, V.C., Bressler, J.P. (2002). Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 978-984.

- Barcelos, G.R., Grotto, D., Serpeloni, J.M., Angeli, J.P., Rocha, B.A., de Oliveira Souza, V.C., Vicentini, J.T., Emanuelli, T., Bastos, J.K., Antunes, L.M., Knasmüller, S., Barbosa, F.Jr. (2011). Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Arch. Toxicol.* 85, 1151-1157.
- Barkay T., Miller S. M., Summers A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 355-384.
- Bauer, E., Jakob, S., Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18, 282-295.
- Behall, K., Reiser, S. (2009). Effects of pectin on human metabolism. En: Chemistry and function of pectins, ACS Symposium Series, 310. Fishman, M. T., Jen, J.J. (eds). American Chemical Society, Washington DC, pp. 248-265.
- Bekhet, G.M., Al-Kahtani, M.A., Abdel-Moneim, A.M. (2013). The protective effects of vitamin C and folic acid against methylmercury teratogenicity in chick embryo. *J. Cell Anim. Biol.* 7, 77-84.
- Berlin, M., Carlson, J., Norseth, T. (1975). Dose-dependence of methylmercury metabolism. A study of distribution, biotransformation and excretion in the squirrel monkey. *Arch. Environ. Health* 30, 307-313.
- Beyer, M.G., Steinhart, H., Kirchgessner, M. (1976). The effect of various pH values on in vitro peptic digestion of proteins in the presence of Cu₂ ions. *Arch. Tierernahr.* 26, 689-695.
- Bisanz, J., Enos, M., Mwangi, J., Chagalucha, J., Jeremy, P., Burton, J.P., Gloor, G.B., Reid, G. (2014). Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. *mBio* 5, e01580-14.
- Branco, V., Vale, C., Canario, J., dos Santos, M.N. (2007). 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.* 150, 373-380.

- Bridges, C.C., Bauch, C., Verrey, F., Zalups, R.K. (2004). Mercuric conjugates of cysteine are transported by the amino acid transporter system b(0,+): implications of molecular mimicry. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 663-673.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K. (2017). Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Arch. Toxicol.* 91, 63-81.
- Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A., Mensink, R.P. (2012). Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hypercholesterolemic men and women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 591-599.
- Bruce, S., Noller, B., Matanitobua, V., Ng, J. (2007). In vitro physiologically based extraction test (PBET) and bioaccessibility of arsenic and lead from various mine waste materials. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 70, 1700-1711.
- Brudnak, M.A. (2002). Probiotics as an adjuvant to detoxification protocols. *Med. Hypotheses* 58, 382-385
- Brune, D., Nordberg, G.F., Vesterberg, O., Gerhardsson, L., Wester, P.O. (1991). A review of normal concentrations of mercury in human blood. *Sci. Total Environ.* 100, 235-282.
- Burger, J., Gochfeld, M. (2004). Mercury in canned tuna: white versus light and temporal variation. *Environ. Res.* 96, 239-249.
- Burger, J., Gochfeld, M. (2011). Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species size, and season. *Sci. Total Environ.* 409, 1418-1429.
- Cabañero, A.I., Madrid, Y., Camara, C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal. Chim. Acta* 526, 51-61.
- Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C. (2007). Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. *Biol. Trace Elem. Res.* 119, 195-211.
- Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., Zhai, G. (2013). Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Curr. Med. Chem.* 20, 2572-2582.

- Calao, C.R., Marrugo, J.L. (2015). Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de La Mojana, Colombia, 2013. *Biomédica* 35, 139-151.
- Calatayud, M., Devesa, V., Virseda, J.R., Barbera, R., Montoro, R., Velez, D. (2012). Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2696-2702.
- Cappon, C.J. (1981). Mercury and selenium content and chemical form in vegetable crops grown on sludge-amended soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10, 673-689.
- CBI (Center for the Promotion of imports from developing countries) (2016). The Netherlands Ministry of Foreign Affairs. Disponible en: <https://www.cbi.eu/node/2611/pdf/>
- Celo, V., Lean, D.R.S., Scott, S.L. (2006), Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 368, 126-137.
- Chan, H.M., Kim, C., Khoday, K., Receveur, O., Kuhnlein, H.V. (1995). Assessment of dietary exposure to trace metals in Baffin Inuit food. *Environ. Health Perspect.* 103, 740-746.
- Chapman, L., Chan, H.M. (2000). The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. *Environ. Health Perspect.* 108, 29-56.
- Cheung, P. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Sci. Hum. Wellness* 2, 162-166.
- China's Ministry of Health. (2012). GB 2762-2012. National Food Safety Standard. Maximum Levels of Contaminants in Food.
- Choi, A.L., Cordier, S., Welhe, P., Grandjean, P. (2008). Negative confounding in the evaluation of toxicity: the case of methylmercury in fish and seafood. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 877-893.
- Chunhieng, T., Pétritis, K., Elfakir, C., Brochier, J., Goli, T., Montet, D. (2004). Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4318-4322.

- Clarkson, T.W., Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609-662.
- Clarkson, T.W., Vyas, J.B., Ballatori, N. (2007). Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am. J. Ind. Med.* 50, 757-764.
- Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D. (2017). *In vitro* reduction of arsenic bioavailability using dietary strategies. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3956-3964.
- Comisión de las Comunidades Europeas (2005). Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo - Estrategia comunitaria sobre el mercurio {SEC(2005) 101}. Bruselas, 28.01.2005. COM(2005) 20 final.
- 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.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26, 767-778.
- Dabeka, R.W., McKenzie, A.D., Bradley, P. (2003). Survey of total mercury in total diet food composites and an estimation of the dietary intake of mercury by adults and children from two Canadian cities, 1998-2000. *Food Add. Contam.* 20, 629-638.
- Dawes, M., Chowienczyk, P.J. (2001). Drugs in pregnancy. Pharmacokinetics in pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 15, 819-826.
- Dean, J.R., Ma, R. (2007). Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere* 68, 1399-1407.
- Del Cerro-Martín, G., Barnuevo Villanueva, J.R., Vega, M.M., Ramos Pino, M., Carrasco Milara, J., Conde Mansilla, A. (2012). Buscando soluciones para la gestión medioambiental responsable del mercurio. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España.

- Desideri, A., Hartmann, H.J., Morante, S., Weser, U. (1990). An EXAFS study of the copper accumulated by yeast cells. *Biol. Met.* 3, 45-47.
- Diaz-Bone, R.A., Van de Wiele, T. (2010). Biotransformation of metal(loid)s by intestinal microorganisms. *Pure Appl. Chem.* 82, 409-427.
- Díaz Huerta, V., Fernández Sánchez, M.L., Sanz-Medel, A. (2004). Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 644-648.
- Directiva 2005/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos de diseño ecológico para lámparas fluorescentes sin balastos integrados, para lámparas de descarga de alta intensidad y para balastos y luminarias que puedan funcionar con dichas lámparas, y se deroga la Directiva 2000/55/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, 22.7.2005.
- Directiva 2006/66/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de septiembre de 2006, relativa a las pilas y acumuladores y a los residuos de pilas y acumuladores, y por la que se deroga la Directiva 91/157/CEE. Diario Oficial de la Unión Europea, 26.9.2006
- Directiva 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de noviembre de 2010, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación). Diario Oficial de la Unión Europea, 17.12.2010
- Dressman, J.B., Berardi, R.R., Dermentzoglou, L.C., Russell, T.L., Schmaltz, S.P., Barnett, J.L., Jarvenpaa, K.M. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceut. Res.* 7, 756-761.
- 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. Polym.* 30, 253-263.
- Dutta, A., Zhou, L., Castillo-Araiza, C., De Herdt, E. (2015). Cadmium(II), lead(II), and copper(II) biosorption on baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J. Environ. Eng.* 142, 1-7.

- EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food (Question No EFSA-Q-2003-030). *EFSA J.* 34, 1-14.
- EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) (2012). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 10, 2985.
- El-Desoky, G.E., Bashandy, S.A., Alhazza, I.M., Al-Othman, Z.A., Aboul-Soud, M.A., Yusuf, K. (2013). Improvement of mercuric chloride-induced testis injuries and sperm quality deteriorations by *Spirulina platensis* in rats. *PLoS One* 8, e59177.
- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1988). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. II. Composite effects of pH and halide ions on transport of mercuric chloride into isolated brush border membrane vesicles in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 63, 361-368.
- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1991). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. IV: Effect of chelating agents and cysteine on absorption of mercuric chloride in situ and in vitro. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 171-176.
- Endo, T., Haraguchi, K., Sakata, M. (2003). Renal toxicity in rats after oral administration of mercury-contaminated boiled whale livers marketed for human consumption. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 412-416.
- Espinoza, A., Le Blanc, S., Olivares, M., Pizarro, F., Ruz, M., Arredondo, M. (2012). Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol. Trace Elem. Res.* 146, 281-286.
- Fagiolino, P., Vázquez, M., Ibarra, M. (2010). Biodisponibilidad y bioequivalencia de medicamentos. En: Tópicos de actualización en Neurología. Beas, C., Ureña, M.E., Rivera, M.C., Pallas, M., Camins, A. (eds.). Universidad de Guadalajara, Guadalajara.

- Fakruddin, M., Hossain, M.N., Ahmed, M.M. (2017) Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complement. Altern. Med.* 17, 64.
- Falandysz, J., Bielawski, L. (2001). Mercury content of wild edible mushrooms collected near the town of Augustow. *Pol. J. Environ. Stud.* 10, 67-71.
- Falandysz, J., Krasinska, G., Pankavec, S., Nnorom, I.C. (2014). Mercury in certain boletus mushrooms from Poland and Belarus. *J. Environ. Sci. Health. Part. B* 49, 690-695.
- Ferreira, I.M.P., Pinho, O., Vieira, E., Tavela, J.G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 77-84.
- Fogh, J., Trempe, G. (1975). New Human Cell Line. En: Human Tumour Cells *in vitro*. Fogh, J. (ed.). Plenum Press, New York.
- Forceville, X. (2006). Seleno-enzymes and seleno-compounds: the two faces of selenium. *Crit. Care* 10, 180.
- Ford, D. (2004). Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 21-29.
- Franciscato, C., Moraes-Silva, L., Duarte, F.A., Oliveira, C.S., Ineu, R.P., Flores, E.M., Dressler, V.L., Peixoto, N.C., Pereira, M.E. (2011). Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 480-486.
- Franco, A.P., Lobo Recio, M.A., Szpoganicz, B., López Delgado, A., Felcman, J., Mercê, A.L.R. (2007). Complexes of carboxymethylcellulose in water. Part 2. Co^{2+} and Al^{3+} remediation studies of wastewaters with Co^{+2} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Vo^{2+} and Mo^{6+} . *Hydrometallurgy* 87, 178-189.

- François, F., Lombard, C., Guigner, J. M., Soreau, P., Brian-Jaisson, F., Martino, G., Vandervennet, M., Garcia, D., Molinier, A. L., Pignol, D., Peduzzi, J., Zirah, S., Rebuffat, S. (2012). Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1097-1106.
- Fredriksson, A., Dahlgren, L., Danielsson, B., Eriksson, P., Dencker, L., Archer, T. (1992). Behavioural effects of neonatal metallic mercury exposure in rats. *Toxicology* 74, 151-160.
- Fredriksson, A., Gårdlund, A.T., Bergman, K., Oskarsson, A., Ohlin, B., Danielsson, B., Archer, T. (1993). Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat offspring exposed to methyl mercury in utero. *Pharmacol. Toxicol.* 72, 377-382.
- Fredriksson, A., Dencker, L., Archer, T., Danielsson, B.R.G. (1996). Prenatal coexposure to metallic mercury vapour and methylmercury produce interactive behavioural changes in adult rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 18, 129-134.
- Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Bertozzi, E., Signorini, M.L., Sequeira, G.J., Marti, L.E., Dalla Santina, R., Perdigon, G., Rosmini, M.R. (2010). Protective effect of an inoculum of lactic acid bacteria from bovine origin against Salmonella serotype Dublin in the intestinal tract of mice. *J. Anim. Vet. Adv.* 9, 2113-2122.
- FSA, Food Standards Agency (2003). Mercury in imported fish and shellfish, UK farmed fish and their products (40/03). Disponible en: <http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis-2003/fsis402003>.
- Fukino, H., Hirai, M., Hsueh, Y.M., Yamane, Y. (1984). Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 395-401.
- Fukino, H., Hirai, M., Hsueh, Y.M., Moriyasu, S., Yamane, Y. (1986). Mechanism of protection by zinc against mercuric chloride toxicity in rats: effects of zinc and mercury on glutathione metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health* 19, 75-89.

- Garrick, M.D., Singleton, S.T., Vargas, F., Kuo, H.C., Zhao, L., Knöpfel, M., Davidson, T., Costa, M., Paradkar, P., Roth, J.A., Garrick, L.M. (2006). DMT1: which metals does it transport? *Biol. Res.* 39, 79-85.
- Gong, Y., Krabbenhoft, D.P., Ren, L., Egelanddal, B., Richards, M.P. (2011). Mercury distribution and lipid oxidation in fish muscle: effects of washing and isoelectric protein precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11050-11057.
- Grandjean, P., Herz, K.T. (2011). Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *Mt. Sinai J. Med.* 78, 107-118.
- Gropper, S.S., Smith J.L., Groff, J.L. (2009). Advanced nutrition and human metabolism (5th edition). Wadsworth, Cengage Learning, Belmont, CA.
- Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Eneind, 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.
- Gworek, B., Bemowska-Kalabun, O., Kijeńska, M., Wrzosek-Jakubowska, J. (2016). Mercury in marine and oceanic waters-a review. *Water Air Soil Pollut.* 227:371.
- 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.
- Hansson, G.C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 57-62.
- Harada, M. (1995). Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 1-24.
- Harris, H.H., Pickering, I.J., George, G.N. (2003). The chemical form of mercury in fish. *Science* 301, 1203.

- 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 (2008). Mercury in Fish: Consumption Advice: Making Informed Decisions about fish. Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/environ/mercur/cons-adv-etud-eng.php>.
- Health Canada (2015). List of permitted food additives with other generally accepted uses. Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/list/8-other-autre-eng.php>.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.* 89, 63-75.
- Hoban, C.A. (2008). Mechanisms for methylmercury cell-to-bath transport by the basolateral membrane of the rabbit proximal tubule. Biology dissertations, paper 49. Department of biology, Georgia State University. Disponible en: http://scholarworks.gsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1048&context=biology_diss.
- Hofmann, A.K., Mysels, K.J. (1992). Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH and Ca²⁺ ions. *J. Lipid Res.* 33, 617-626.
- Højbjerg, S., Nielsen, J.B., Andersen, O. (1992). Effects of dietary lipids on whole-body retention and organ distribution of organic and inorganic mercury in mice. *Food Chem. Toxicol.* 30, 703-708.
- Holmes, P., James, K.A., Levy, L.S. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci. Total Environ.* 408, 171-182.

- Hoppe, M., Onning, G., Berggren, A., Hulthen, L. (2015). Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v increases iron absorption from an iron-supplemented fruit drink: a double-isotope cross-over single-blind study in women of reproductive age. *Br. J. Nutr.* 114, 1195-1202.
- Hunter, J., Jepson, M.A., Tsuruo, T., Simmons, N.L., Hirst, B.H. (1993). Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J. Biol. Chem.* 268, 14991-14997.
- Huq, M.A., Awal, M.A., Mostofa, M., Ghosh, A., Das, A.R. (2008). Effects of vitamin E and vitamin C on mercury induced toxicity in mice. *Progress Agric.* 19, 93-100.
- Hylander, L.D., Meili, M. (2003). 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci. Total Environ.* 304, 13-27.
- IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) (1993). Mercury and mercury compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 58, 239-345.
- Infante, J.C., De Arco, R.D., Angulo, M.E. (2014). Removal of lead, mercury and nickel using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 19, 4141-4149.
- IOM (Institute of Medicine US) (2000). Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC), National Academies Press (US).
- IPCS (Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas) (2003). Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document 50. Disponible en: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>).

- Iwasaki, Y., Sakamoto, M., Nakai, K., Oka, T., Dakeishi, M., Iwata, T., Satoh, H., Murata, K. (2003). Estimation of daily mercury intake from seafood in Japanese women: Akita cross-sectional study. *Tohoku J. Exp. Med.* 200, 67-73.
- Jambou, R., Le Bras, J., Randrianarivejosia, M. (2011). Pitfalls in new artemisinin-containing antimalarial drug development. *Trends Parasitol.* 27, 82-90.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (1979). Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Seventeenth Report of JECFA, World Health Organization Technical Report Series No. 539.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2000). Safety evaluation of certain food additives and contaminant. International programme on chemical safety. WHO food additives series: 44. Fifty-third meeting of JECFA, Geneva.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee) (2001). Probiotics in food. Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO Food and nutrition paper 85, Córdoba, Argentina.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2003). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series No. 52, prepared by the sixty-first meeting of JECFA. World Health Organization, Geneva.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting of JECFA. FAO JECFA Monographs 8, Rome.
- Jedrzejczak, R. (2002). Determination of total mercury in foods of plant origin in Poland by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Food Addit. Contam.* 19, 996-1002.

- Jin, X., Lok, E., Bondy, G., Caldwell, D., Mueller, R., Kapal, K., Armstrong, C., Taylor, M., Kubow, S., Mehta, R., Chan, H.M. (2007). Modulating effects of dietary fats on methylmercury toxicity and distribution in rats. *Toxicology* 230, 22-44.
- Jones, M., Gu, X., Stebbins, N., Crandal, P., Ricke, S., Lee, S.-O. (2015). Effects of soybean pectin on blood glucose and insulin responses in healthy men. *FASEB J.* 29, 596.16.
- Jonker, D., Woutersen, R.A., van Bladeren, P.J., Til, H.P., Feron, V.J. (1993). Subacute (4-wk) oral toxicity of a combination of four nephrotoxins in rats: comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food Chem. Toxicol.* 31, 125-136.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem.* 113, 9-16.
- Kalač, P., Svoboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.* 69, 273-281.
- Kaneko, J.J., Ralston, N.V.C. (2007). Selenium and mercury in pelagic fish in the central north Pacific near Hawaii. *Biol. Trace Elem. Res.* 119, 242-254.
- 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.
- King, J.K., Kostka, J.E., Frischer, M.E., Saunders, F.M. (2000). Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2430-2437.
- Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T., Kimura, K. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Res. Microbiol.* 164, 701-709.

- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1990-1995.
- Kolev, S.T., Bates, N. (2005). Mercury. (UK PID). National Poisons Information Service: Medical Toxicology Unit. United Kingdom. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid27.htm>.
- Kratzer, F.H., Porter, J.W.G. (1962). The effect of pH on the digestion of proteins in vitro by pepsin. *Br. J. Nutr.* 16, 579-584.
- Krupp, E.M., Milne, B.F., Mestrot, A., Meharg, A.A., Feldmann, J. (2008). Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1753-1764.
- Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. (2004). Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit. Contam.* 21, 158-164.
- Landry, T.D., Doherty, R.A., Gates, A.H. (1979). Effects of three diets on mercury excretion after methylmercury administration. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 151-158.
- Laparra, J.M., Vélez, D., Montoro, R., Barberá, R., Farré, R. (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6080-6085.
- Laird B.D., Shade C., Gantner N., Chan H.M., Siciliano S.D. (2009). Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration. *Sci. Total Environ.* 407, 6003-6008.

- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., Scarino, M.L. (2001). *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern. Lab. Anim.* 29, 649-668.
- Leblanc, J.G., de Moreno de LeBlanc, A., Perdigon, G., Miyoshi, A., Rochat, T., Bermudez-Humaran, L., Langella, P., Sesma, F., Azevedo, V. (2008). Anti-inflammatory properties of Lactic Acid Bacteria: Current knowledge, applications and prospects. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* 7, 148-154.
- Lesjak, M., Hoque, R., Balesaria, S., Skinner, V., Debnam, E.S., Srai, S.K., Sharp, P.A. (2014). Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One* 9, e102900.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 50, 6334-6343.
- Lin, M.Y., Yen, C.L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1460-1466.
- Liu, Y., Guo, M. (2015). Studies on transition metal-quercetin complexes using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Molecules* 20, 8583-8594.
- Ljungh A., Wadström T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7, 73-89.
- Ludwicki, J.K. (1990). In vitro methylation and demethylation of mercury compounds by the intestinal contents. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 357-362.
- Machado, M.D., Santos, M.S. F., Gouveia, C., Soares, H.M.M., Soares, E.V. (2008). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process. *Bioresour. Technol.* 99, 2107-2115.

- Machado, M.D., Janssens, S., Soares, H., Soares, E.V. (2009). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1792-1804.
- Magos, L., Webb, M. (1977). The effect of selenium on the brain uptake of methylmercury. *Arch. Toxicol.* 38, 201-207.
- Mahaffey, K.R., Clickner, R.P., Bodurow, C.C. (2004). Blood organic mercury and dietary mercury intake: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 and 2000. *Environ. Health Perspect.* 112, 562-570.
- Majlesi, M., Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H.R., Nazifi, S., Sajedianfard, J., Eskandari, M.H. (2017). Effect of probiotic *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on alleviation of mercury toxicity in rat. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 10.1007/s12602-016-9250-x.
- 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, 1198-1E203.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165, 36-46.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.* 73, 321-325.
- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., Fardel, O. (2007). Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 659-663.
- Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufils, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J.F., Zagorec, M., Francke, C., Hartke, A., Deutscher, J. (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J. Bacteriol.* 192, 2647-2648.

- McCollister, S.B., Kociba, R.J., McCollister, D.D. (1973). Dietary feeding studies of methylcellulose and hydroxypropylmethyl cellulose in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol.* 11, 943-953.
- McFarland, L.V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 16, 2202-2222.
- Miettinen, J.K., Rahola, T., Hattula, T., Rissanen, K., Tillander, M. (1971). Elimination of ²⁰³Hg-methylmercury in man. *Ann. Clin. Res.* 3, 116-122.
- Miettinen, J.K. (1973). Absorption and elimination of dietary mercury (Hg²⁺) and methylmercury in man. En: Mercury, mecurials and mercaptans. Miller, M.W., Clarkson, T.W (eds). Springfield. pp. 233-246.
- Mishra, S., Ghosh, D., Dutta, M., Chattopadhyay, A., Bandyopadhyay, D. (2015). Tannic acid protects against cadmium-induced renal damages of male albino rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 32, 273-281.
- Mitsumori, K., Maita, K., Saito, T., Tsuda, S., Shirasu, Y. (1981). Carcinogenicity of methylmercury chloride in ICR mice: Preliminary note on renal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 12, 305-310.
- Mitsumori, K., Hirano, M., Ueda, H., Maita, K., Shirasu, Y. (1990). Chronic toxicity and carcinogenicity of methylmercury chloride in B6C3F1 mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, 179-190.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., De Smet, I., Verstraete, W. (1994). Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microb. Ecol. Health Dis.* 7, 191-200.
- Monachese, M., Burton, J.P., Reid, G. (2012). Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6397-6404.
- Monteiro, L.R., Lopes, H.D. (1990). Mercury content of swordfish *Xiphias gladius* in relation to length, weight, age and sex. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 293-296.

- Morgan, J.N., Berry, M.R., Graves, R.L. (1997). Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 7, 119-133.
- Mori, N., Yamamoto, M., Tsukada, E., Yokooji, T., Matsumura, N., Sasaki, M., Murakami, T. (2012). Comparison of *in vivo* with *in vitro* pharmacokinetics of mercury between methylmercury chloride and methylmercury cysteine using rats and Caco2 cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 628-636.
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L.L., Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients* 2, 449-473.
- Nagita, A., Amemoto, K., Yoden, A., Aoki, S., Sakaguchi, M., Ashida, K., Mino, M. (1996). Diurnal variation in intragastric pH in children with and without peptic ulcers. *Pediatr. Res.* 40, 528-532.
- Nakao, M., Seoka, M., Nakatani, M., Okada, T., Miyashita, S., Tsukamasa, Y., Kawasaki, K., Ando, M. (2009). Reduction of mercury levels in cultured bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, using feed with relatively low mercury levels. *Aquaculture* 288, 226-232.
- Ng, J.C, Juhasz, A.L., Smith, E., Naidu, R. (2009). Contaminant bioavailability and bioaccessibility - Part 2: Guidance for industry. CRC CARE Technical Reports 14.
- Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Andersen, O., Starklint, H. (1991). Mercuric chloride-induced kidney damage in mice: time course and effect of dose. *J. Toxicol. Environ. Health*, 34, 469-483.
- NRC (United States National Research Council) (2000). Toxicological effects of methylmercury. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 344.
- NRC (United States National Research Council) (2003). Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications. National Academies Press: Washington, D.C., pp. 432.

- NTP (Programa Toxicológico Nacional de los Estados Unidos). (1993). Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 408, pp. 260.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-5426.
- Olivero-Verbel, J., Carranza-Lopez, L., Caballero-Gallardo, K., Ripoll-Arboleda, A., Muñoz-Sosa, D. (2016). Human exposure and risk assessment associated with mercury pollution in the Caqueta River, Colombian Amazon. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 20761-20771.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2003). Concise International Chemical Assessment Document 50. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Geneva, World Health Organization.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2005). Mercury in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization.
- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J., Sips, A.J., Van Wijnen, J.H. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3326-3334.
- Orct, T., Lazarus, M., Jurasović, J., Blanusa, M., Piasek, M., Kostial, K. (2009). Influence of selenium dose on mercury distribution and retention in suckling rats. *J. Appl. Toxicol.* 29, 585-589.
- Ostos, C., Pérez-Rodríguez, F., Moreno Arroyo, B., Moreno-Rojas, R. (2015). Study of mercury content in wild edible mushrooms and its contribution to the Provisional Tolerable Weekly Intake in Spain. *J. Food Comp. Anal.* 37, 136-142.

- Ouédraogo, O., Amyot, M. (2011). Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish. *Environ. Res.* 111, 1064-1069.
- Oyetayo, F.L., Akindahunsi, A.A., Oyetayo, V.O. (2007). Chemical profile and amino acids composition of edible mushrooms *Pleurotus sajor-caju*. *Nutr. Health* 18, 383-389.
- Özer, A., Özer, D. (2003). Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. *J. Hazard. Mater.* 100, 219-229.
- Park, J.K., Lee, J.W., Jung, J.Y. (2003). Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 371-378.
- Peixoto, N.C., Roza, T., Flores, E.M., Pereira, M.E. (2003). Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146, 17-25.
- Peña, M.M., Puig, S., Thiele, D.J. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* 275, 33244-33251.
- Pérez-Conesa, D., López G., Abellán P., Ros G. (2006). Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and synbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2327-2336.
- 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.
- Piper, D.W., Fenton, B.H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* 6, 506-508.

- Pirrone, N., Cinnirella, S., Feng, X., Finkelman, R.B., Friedli, H.R., Leaner, J., Mason, R., Mukherjee, A.B., Stracher, G.B., Streets, D.G., Telmer, K. (2010). Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmos. Chem. Phys.* 10, 5951-5964.
- Plessi, M., Bertelli, D., Monzani, A. (2001). Mercury and selenium content in selected seafood. *J. Food Compos. Anal.* 14, 461-467.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P. (2001). HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.* 90, 1608-1619.
- Rahola, T., Hattula, T., Korolainen, A., Miettinen, J.K. (1973). Elimination of free and protein-bound ionic mercury (20Hg^{2+}) in man. *Ann. Clin. Res.* 5, 214-219.
- Ralston, N.V., Blackwell, J.L., Raymond, L.J. (2007). Importance of molar ratios in selenium-dependent protection against methylmercury toxicity. *Biol. Trace Elem. Res.* 119, 255-268.
- Ralston, N.V., Ralston, C.R., Blackwell, J.L., Raymond, L.J. (2008). Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology* 29, 802-811.
- Ralston, N.V., Raymond, L.J. (2010). Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology* 278, 112-123.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T. (2007). Effects of canning on total mercury, protein, lipid, and moisture content in troll-caught albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chem.* 3, 1130-1135.
- Raymond, L.J., Ralston, N.V.C. (2006). Selenium prevents and reverses methylmercury toxicity. *Neurotoxicology* 27, 1172-1173.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE, num 34, viernes 8 de febrero de 2013. Sec. I. Pág. 11370.

Reglamento (CE) n° 629/2008 de la Comisión, de 2 de julio de 2008, que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 03/07/2008, L173/1-9.

Reglamento (UE) n° 420/2011 de la Comisión, de 29 de abril de 2011, que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios *Diario Oficial de la Unión Europea*, 30/04/2012, L111/3-6.

Reglamento (UE) n° 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 12/11/2011, L295/1-177.

Reglamento n° 847/2012 de la Comisión, de 19 de septiembre de 2012, por el que se modifica, en lo que respecta al mercurio, el anexo XVII del Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH). *Diario Oficial de la Unión Europea*, 20/09/2012, L 253/1-4.

Reglamento de ejecución (UE) n° 872/2012 de la Comisión de 1 de octubre de 2012 por el que se adopta la lista de sustancias aromatizantes prevista en el Reglamento (CE) n° 2232/96 del Parlamento Europeo y del Consejo, se incluye dicha lista en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, y se derogan el Reglamento (CE) n° 1565/2000 de la Comisión y la Decisión 1999/217/CE de la Comisión.

Roos, D.H., Puntel, R.L., Lugokenski, T.H., Ineu, R.P., Bohrer, D., Burger, M.E., Franco, J.L., Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B., de Vargas Barbosa, N.B. (2010). Complex methylmercury-cysteine alters mercury accumulation in different tissues of mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107, 789-792.

Rothstein, A., Auran, J.D., Flynn, J.T. (2003). Mercury in ophthalmic medications. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4452.

- Rowland, I., Davies, M., Grasso, P. (1977). Biosynthesis of methylmercury compounds by the intestinal flora of the rat. *Arch. Environ. Health* 32, 24-28.
- Rowland, I.R., Davies, M.J., Grasso, P. (1978). Metabolism of methylmercuric chloride by the gastro-intestinal flora of the rat. *Xenobiotica* 8, 37-43.
- Rowland, I.R., Davies, M.J., Evans, J.G. (1980). Tissue content of mercury in rats given methylmercuric chloride orally: influence of intestinal flora. *Arch. Environ. Health* 35, 155-160.
- 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.
- Sahi, J., Nataraja, S.G., Layden, T.J., Goldstein, J.L., Moyer, M.P., Rao, M.C. (1998). Cl⁻ transport in an immortalized human epithelial cell line (NCM460) derived from the normal transverse colon. *Am. J. Physiol.* 275, C1048-C1057.
- Sahuquillo, I., Lagarda, M.J., Silvestre, M.D., Farré, R. (2007). Methylmercury determination in fish and seafood products and estimated daily intake for the Spanish population. *Food Addit. Contam.* 24, 869-876.
- Sakamoto, M., Yasutake, A., Kakita, A., Ryufuku, M., Chan, H.M., Yamamoto, M., Oumi, S., Kobayashi, S., Watanabe, C. (2013). Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2862-2868.
- 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.
- Schab, R., Sachs, K., Yannai, S.A. (1978). Proposed industrial method for the removal of mercury from fish. *J. Sci. Food Agric.* 29, 274-280.

- Schmidt, L., Bizzi, C.A., Duarte, F.A., Muller, E.I., Krupp, E., Feldmann, J., Flores, E.M.M. (2015). Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish. *Food Control* 47, 413-419.
- Seki, H., Suzuki, A., Maruyama, H. (2005). Biosorption of chromium(VI) and arsenic(V) onto methylated yeast biomass. *J. Colloid Interface Sci.* 281, 261-266.
- Seko, Y., Miura, T., Takahashi, M., Koyama, T. (1981). Methyl mercury decomposition in mice treated with antibiotics. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 49, 259-265.
- Sener, G., Sehirli, O., Tozan, A., Velioglu-Ovunc, A., Gedik, N., Omurtag, G.Z. (2007). *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem. Toxicol.* 45, 543-550.
- Serguschenko, I., Kolenchenko, E., Khotimchenko, M. (2007). Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. *Nutr. Res.* 27, 633-639.
- Sharma, M.K., Kumar, M., Kumar, A. (2002). *Ocimum sanctum* aqueous leaf extract provides protection against mercury induced toxicity in Swiss albino mice. *Indian J. Exp. Biol.* 40, 1079-1082.
- Sheehan, M.C., Burke, T.A., Navas-Acien, A., Breysse, P.N., McGready, J., Fox, M.A. (2014). Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 92, 254-269.
- 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.
- Smith, J.C., Farris, F.F. (1996). Methyl mercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 245-252.
- Storelli, M.M., Stuffer, R.G., Marcotrigiano, G.O. (2002). Total and methylmercury residues in tuna-fish from the Mediterranean Sea. *Food Addit. Contam.* 19, 715-720.

- Storelli, M.M., Ceci, E., Storelli, A., Marcotrigiano, G.O. (2003). Polychlorinated biphenyl, heavy metal and methylmercury residues in hammerhead sharks: contaminant status and assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1035-1039.
- Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G.F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., Senner, F. (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Rev. Drug Discov.* 9, 597-614.
- Sumathi, T., Shobana, C., Christinal, J., Anusha, C. (2012). Protective effect of *Bacopa monniera* on methyl mercury-induced oxidative stress in cerebellum of rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 979-987.
- Tavelin, S. (2003). New approaches to studies of paracellular drug transport in intestinal epithelial cell monolayers. PhD Dissertation. Uppsala University, Suecia.
- Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W. (2012). *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 150, 264.
- Tomaszewska, E., Dobrowolski, P., Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Tomczyk, A., Muszyński, S. (2017). The effect of tannic acid on the bone tissue of adult male Wistar rats exposed to cadmium and lead. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 131-141.
- Torres-Escribano, S., Vélez, D., Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Add. Contam. Part A.* 27, 327-337.
- Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Velez, 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.
- Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A. (2004). Bioavailability and its assessment. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 455-466.

- Tüzmen, M.N., Yücel, N.C., Kalburcu, T., Demiryas, N. (2015). Effects of curcumin and tannic acid on the aluminum- and lead-induced oxidative neurotoxicity and alterations in NMDA receptors. *Toxicol. Mech. Methods* 25, 120-127.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* 141, 769-776.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2008). Technical background report to the global atmospheric mercury assessment. Arctic Monitoring and Assessment Programme. UNEP Chemicals Branch, Geneva.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2010). Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Estudio sobre las fuentes y emisiones de mercurio y análisis del costo y la eficacia de las medidas de control. UNEP(DTIE)/Hg/INC.2/4. “Estudio del PNUMA pedido en el párrafo 29” División de Tecnología, Industria y Economía (DTIE) Subdivisión de Productos Químicos. Geneva.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2013). Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva.
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (1999). Integrated Risk Information System (IRIS) on mercuric chloride. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (2001). Water quality criterion for the protection of human health: Methylmercury (EPA 823-R-10-001).
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (2007a). Guidance for Evaluating the Oral Bioavailability of Metals in Soils for Use in Human Health Risk Assessment. OSWER 9285.7-80.

- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (2007b). Estimation of Relative Bioavailability of Lead in Soil and Soil-like Materials Using in Vivo and in Vitro Methods. OSWER 9285, 7-77.
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (2007c). Standard Operating Procedure for an In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil. OSWER 9200.1-86.
- Vázquez, M., Calatayud, M., Vélez, D., Devesa, V. (2013). Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells. *Toxicology* 311, 147-153.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V. (2014a). In vitro characterization of the intestinal absorption of methylmercury using a Caco-2 cell model. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 254-264.
- Vázquez, M. (2014b). Mecanismos de transporte y toxicidad intestinal de especies de mercurio presentes en los alimentos. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Vázquez, M., Devesa, V., Vélez, D. (2015a). Characterization of the intestinal absorption of inorganic mercury in Caco-2 cells. *Toxicol. In vitro* 29, 93-102.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V. (2015b). Participation of $b^{0,+}$ and $B^{0,+}$ systems in the transport of mercury bound to cysteine in intestinal cells. *Toxicol. Res.* 4, 895-900.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V., Puig, S. (2015c). Participation of divalent cation transporter DMT1 in the uptake of inorganic mercury. *Toxicology* 331, 119-124.
- Venema, K., van Nuenen, H.M.C., Smeets-Peeters, M., Minekus, M., Havenaar, R. (2000). TNO's in vitro large intestinal model: an excellent screening tool for functional food and pharmaceutical research. *Nutrition* 24, 558-564.

- Versantvoort, C.H.M., Van de Kamp, E., Rompelberg, C.J.M. (2004). Development of an in vitro digestion model to determine the bioaccessibility of contaminants from food. Report no. 320102002. National Institute for Public Health and the Environment. Bilthoven. The Netherlands. Disponible en: <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/8885/1/320102002.pdf>
- Walsh, C.T. (1982). The influence of age on the gastrointestinal absorption of mercuric chloride and methylmercury chloride in the rat. *Environ. Res.* 27, 412-420.
- Watras, C., Huckabee, J. (1994). Mercury pollution: integration and synthesis. Huckabee, J.W. (ed.), Lewis publishers. Boca Raton, Florida.
- Watts, J., Howell, E., Merl, J.K. (2014). Theoretical studies of complexes between Hg(II) ions and L-cysteinate amino acids. *Int. J. Quantum Chem.* 114, 333-339.
- Weis, C.P., LaVelle, J.M. (1991) Characteristics to consider when choosing an animal model for the study of lead bioavailability. *Chem. Spec. Bioavailab.* 3, 113-119.
- Wickramasinghe, P., Bhuiyan, S.A., Croft, B.J. (2015). Efficacy of new chemicals to control pineapple sett rot of sugarcane. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.* 37
- 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.
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., Tokuda, H. (2000). Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 195-204.
- Yang, H.R., Kim, N.Y., Hwang, L.H., Park, J.S., Kim, J.H. (2015). Mercury contamination and exposure assessment of fishery products in Korea. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 8, 44-49.

- Yang, X.W., Yang, X.D., Wang, Y., Ma, L., Zhang, Y., Yang, X.G., Wang, K. (2007). Establishment of Caco-2 cell monolayer model and standard operation procedure for assessing intestinal absorption of chemical components of traditional Chinese medicine. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 5, 634-641.
- Yannai, S., Saltzman, R. (1973). Elimination of mercury from fish. *J. Sci. Food Agric.* 24, 157-160.
- Yannai, S., Sachs, K.M. (1993). Absorption and accumulation of cadmium, lead and mercury from foods by rats. *Food Chem. Toxicol.* 31, 351-355.
- Yasutake, A., Hirayama, K., Inoue, M. (1990). Interaction of methylmercury compounds with albumin. *Arch. Toxicol.* 64, 639-643.
- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharm. Res.* 14, 763-766.
- Yi, Y.J., Lim, J.M., Gu, S., Wan-Kyu Lee, W.K., Oh, E., Lee, S.M., Oh, B.T. (2017). Potential use of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* as a probiotic for the removal of Pb(II) toxicity. *J. Microbiol.* 55, 296.
- Yip, R.K., Chang, L.W. (1982). Protective effects of vitamin E on methylmercury toxicity in the dorsal root ganglia. *Environ. Res.* 28, 84-95.
- Young, R.A. (1992). Toxicity summary of methyl mercury. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program. February 1992.
- Yu, Y.X., Li, J.L., Zhang, X.Y., Yu, Z.Q., Van de Wiele, T., Han, S.Y., Wu, M.H., Sheng, G.Y., Fu, J.M. (2010). Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents. *J. Agric. Food Chem.* 58, 301-308
- Zalups, R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52, 13-143.
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Chen, W. (2013). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1508-1515.

- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Narbad, A., Chen, Y.Q., Zhang, H., Tian, F., Chen, W. (2014). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4063-4071.
- Zhai, Q., Narbad, A., Chen, W. (2015). Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients* 7, 552-571.
- 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.
- Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., Sohrabvandi, S. (2014). Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini-Rev. Med. Chem.* 14, 84-98.

Anexo

Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral ha dado lugar a 6 publicaciones científicas en revistas del primer cuartil del área de toxicología y de ciencia de los alimentos:

- Jadán-Piedra, C., Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D. (2016). Influence of physiological gastrointestinal parameters on the bioaccessibility of mercury and selenium from swordfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (3), 690-698. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05046.
- Jadán-Piedra, C., Sánchez, V., Vélez, D., Devesa, V. (2016). Reduction of mercury bioaccessibility using dietary strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 10-16. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.03.015.
- Jadán-Piedra, C., Alcántara, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V. (2017). The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chemistry*, 228, 158-166. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.157.
- Jadán-Piedra, C., Baquedano, M., Puig, S., Vélez, D., Devesa, V. (2017). Use of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce the bioaccessibility of mercury from food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (13), 2876-2882. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00285.
- Jadán-Piedra, C., Matuoka Chiocchetti, G., Clemente, M.J., Vélez, D., Devesa, V. (2017). Dietary compounds as modulators of metals and metalloids toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI:10.1080/10408398.2017.1302407.
- Alcántara, C., Jadán-Piedra, C., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., Monedero, V. (2017). Characterization of the binding capacity of mercurial species in *Lactobacillus* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Article in Press. DOI: 10.1002/jsfa.8388.

