



Organización de Productores
de Buques Congeladores de
Merlúcidos, Cefalópodos y
Especies Varias

Estudios de absorción y biodisponibilidad de Hg Y Me-Hg in vitro e in vivo y estudio del papel protector del selenio en diferentes especies de pescado

MEMORIA FINAL

15/12/2017



Contenido

1. INTRODUCCIÓN	2
2. TAREAS	3
2.1. MUESTREO Y PREPARACIONES CULINARIAS	3
2.2. RESULTADOS DE MERCURIO Y METIL MERCURIO.....	7
2.3. RESULTADOS DE MERCURIO, METILMERCURIO Y SELENIO.	13
3. BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	22
3.1. Bioaccesibilidad <i>in vitro</i>	22
3.2. Biodisponibilidad <i>in vitro</i>	28
4. BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD <i>in vivo</i>	34
4.1. Pienso control.....	35
4.2. Quella	35
4.3. Marrajo.....	39
4.4. Pez Espada.....	41
4.5. Datos finales – Hg y Se eliminados en los experimentos <i>in vivo</i> con roedores alimentados con piensos adicionados con quella, marrajo y pez espada	43
4.6. Datos finales – Hg y Se en sangre en los experimentos <i>in vivo</i> con roedores alimentados con piensos adicionados con quella, marrajo y pez espada	47
5. CONCLUSIONES FINALES	50

1. INTRODUCCIÓN

El mercurio es un contaminante que puede estar presente en el medio ambiente de varias formas químicas: mercurio inorgánico y mercurio orgánico, como el metil-mercurio (Me-Hg). Para la mayor parte de la población, la dieta es la principal vía de exposición a este contaminante. En general, los productos de la pesca, pueden contener mercurio orgánico, en la forma de Me-Hg, mientras que el mercurio inorgánico es la forma más abundante en otros alimentos (EFSA, 2012). Ambas formas químicas tienen algún grado de toxicidad, especialmente el Me-Hg que resulta neurotóxico. La principal ruta de exposición es la oral, por lo tanto, la absorción intestinal es un paso decisivo mediante el cual el Hg alcanza la circulación sistémica. Sin embargo, hay muy pocos estudios que caracterizan esta absorción en el intestino. Por lo tanto, en este trabajo nos planteamos evaluar los efectos tóxicos del Hg y del Me-Hg, mediante estudios de bioaccesibilidad, es decir la cantidad que se libera del alimento a los fluidos gastrointestinales, y de biodisponibilidad o cantidad que se absorbe a través del intestino y llega a la circulación sanguínea estando disponible para promover su acción en el organismo. Por otro lado, se pretende estudiar el papel del selenio (Se), un elemento muy abundante en el pescado de origen marino que presenta una elevada afinidad por el mercurio, ejerciendo de esta forma, un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor.

A petición de la Organización de Productores de Buques Congeladores de Merlúcidos, Cefalópodos y Especies Varias – OPPC-3, se ha desarrollado el presente trabajo con el objetivo de evaluar la exposición real del consumidor al mercurio y sus derivados a través de la ingesta de ciertos pescados capturados mediante palangre, teniendo en cuenta su preparación culinaria.

El presente informe es el resultado final del trabajo desarrollado en 2017, donde también figuran las tareas y resultados preliminares obtenidos en 2015 y 2016.

2. TAREAS

2.1.MUESTREO Y PREPARACIONES CULINARIAS

Se realizó un muestreo de pez espada, tintorera y marrajo de distintos tamaños comerciales y procedentes de distintas zonas de captura: Océano Atlántico, Pacífico e Índico (zonas FAO). Se recogió una muestra representativa de cada ejemplar que se corresponde con un mínimo de 300 g de peso.

En la tabla 1 se muestra una relación de muestras de pez espada, marrajo y quella o tintorera, identificadas según la zona de captura. Se ha recogido el peso en Kg y el tamaño en cm (longitud a la horquilla, LH) y las recetas que se han preparado para la elaboración culinaria de cada pescado.

Tabla 1: Muestras empleadas en el estudio. Zona de captura, tamaño, peso y preparaciones culinarias

ESPECIE	TALLA	ZONA	PESO (kg)	TALLA LH (cm)	receta 1	receta 2
Pez Espada	<10 kg	ATLÁNTICO	7,2	68	Pez Espada a la Plancha	Pez Espada Guisado
	10-30 kg	NORTE	11,5	83		
	30-50 kg		45	121		
	50-100		90	145		
	>100 kg		123	166		
	<10 kg	ÍNDICO	6,5	65		
			8,5	69		
	10-30 kg		12	82		
	30-50 kg		44	120		
	50-100 kg		87	163		
Marrajo	<10 kg	ATLÁNTICO	5	60	Marrajo en Adobo	Marrajo a la Plancha
	10-30 kg	NORTE	29	115		
	30-50 kg		43	124		
	>100 kg		150	201		
	<10 kg	ÍNDICO	5,5	66		
	10-30 kg		28	109		
	>100 kg		145	184		
Tintorera (Quella)	<7 kg	ATLÁNTICO	3,5	83	Quella frita en adobo	Cazuela de Quella
	12-20 kg	NORTE	17	123		
	<7 kg	ÍNDICO	5	82		
	7-12 kg		11	103		
	12-20 kg		16	126		
		18	124			

Las muestras se enviaron congeladas al laboratorio de ANFACO-CECOPECA donde se mantuvieron en congelación hasta su preparación y análisis. Una parte se estudió en crudo y la otra parte de las muestras se destinó a realizar dos preparaciones culinarias, según el pescado en cuestión, tal y como recogen las recetas que se exponen a continuación. Se elaboraron dos preparaciones Por especie:

2.1.1. PEZ ESPADA (*Xiphias gladius*)

Receta 1: pez espada a la plancha

Se deja reposar el pescado cortado en rodajas en una mezcla de limón y sal, durante 1/2 hora
Calentar la plancha y pasar el pescado por los dos lados.

Receta 2: pez espada guisado

Se prepara en una cazuela un chorro de aceite, se calienta, se adiciona el pez espada cortado en dados, se deja sofreír y se añade agua, se deja que hierva durante 10-12 minutos.



Figura 1: Pez espada crudo, preparación previa y corte en rodajas



Figura 2: Pez espada después de macerarlo en limón, cocinado a la plancha y guisado.

2.1.2. MARRAJO (*Isurus oxyrinchus*)

Receta 1: marrajo en adobo (vinagre y limón)

Trocear el marrajo en dados y poner a macerar 24 horas en una mezcla de aceite, vinagre y zumo de limón, con una pizca de sal.

Transcurrido este tiempo, sacar el pescado del macerado y secar con papel absorbente.

Enharinar, retirar exceso de harina y freír en aceite muy caliente.

Receta 2: marrajo a la plancha (macerado en limón)

Se deja reposar el pescado cortado en rodajas en una mezcla de limón y sal, durante 1/2 hora
Calentar la plancha y pasar los filetes de marrajo por la plancha.



Figura 3: Marrajo crudo, preparación previa y corte en rodajas.



Figura 4: Marrajo macerado 24 h en el adobo y frito posteriormente.

2.1.3. QUELLA O TINTORERA (*Prionace glauca*)

Receta 1: quella frita en adobo (macerada en vinagre)

Macerar en vino y vinagre (en partes iguales) y sal, con un chorrito de aceite, durante 4 horas.

Transcurrido este tiempo, sacar el pescado del macerado y secar con papel absorbente.

Enharinar, retirar exceso de harina y freír en aceite muy caliente

Receta 2: cazuela de quella

Enharinar, retirar el exceso de harina y freír en aceite muy caliente

Incorporar el pescado a la cazuela (en la que se ha rehogado previamente cebolla, ajo, perejil, y sal), regar con vino y cocinar a fuego lento durante 10 minutos.



Figura 5: Quella cruda, preparación previa y corte en rodajas.



Figura 6: Preparación de quella frita en adobo.



Figura 7: Preparación de cazuela de quella.

2.2. RESULTADOS DE MERCURIO Y METIL MERCURIO

Las muestras cocinadas fueron analizadas para comparar el efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metil mercurio. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 8 a 13:

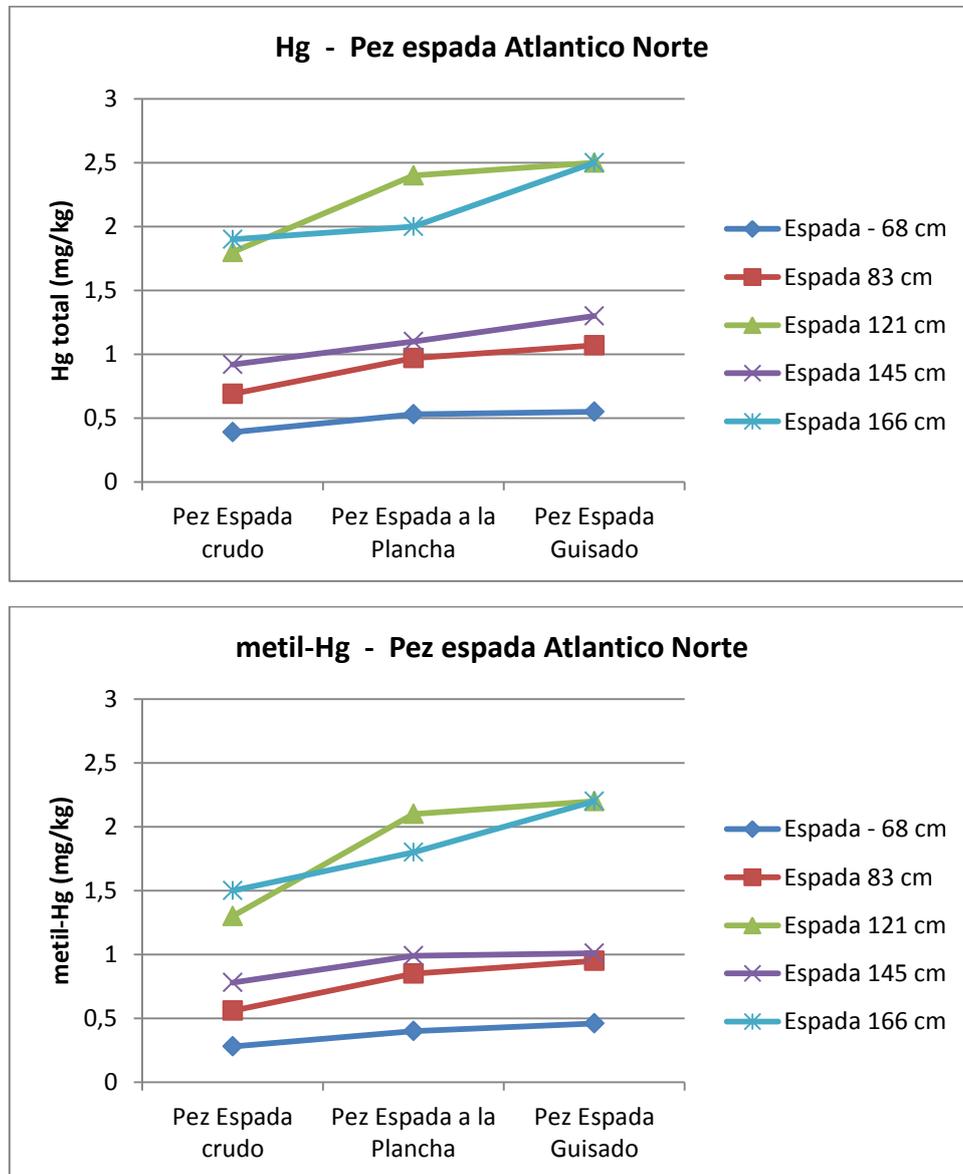


Figura 8: Efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metilmercurio en pez espada capturado en el Atlántico Norte.

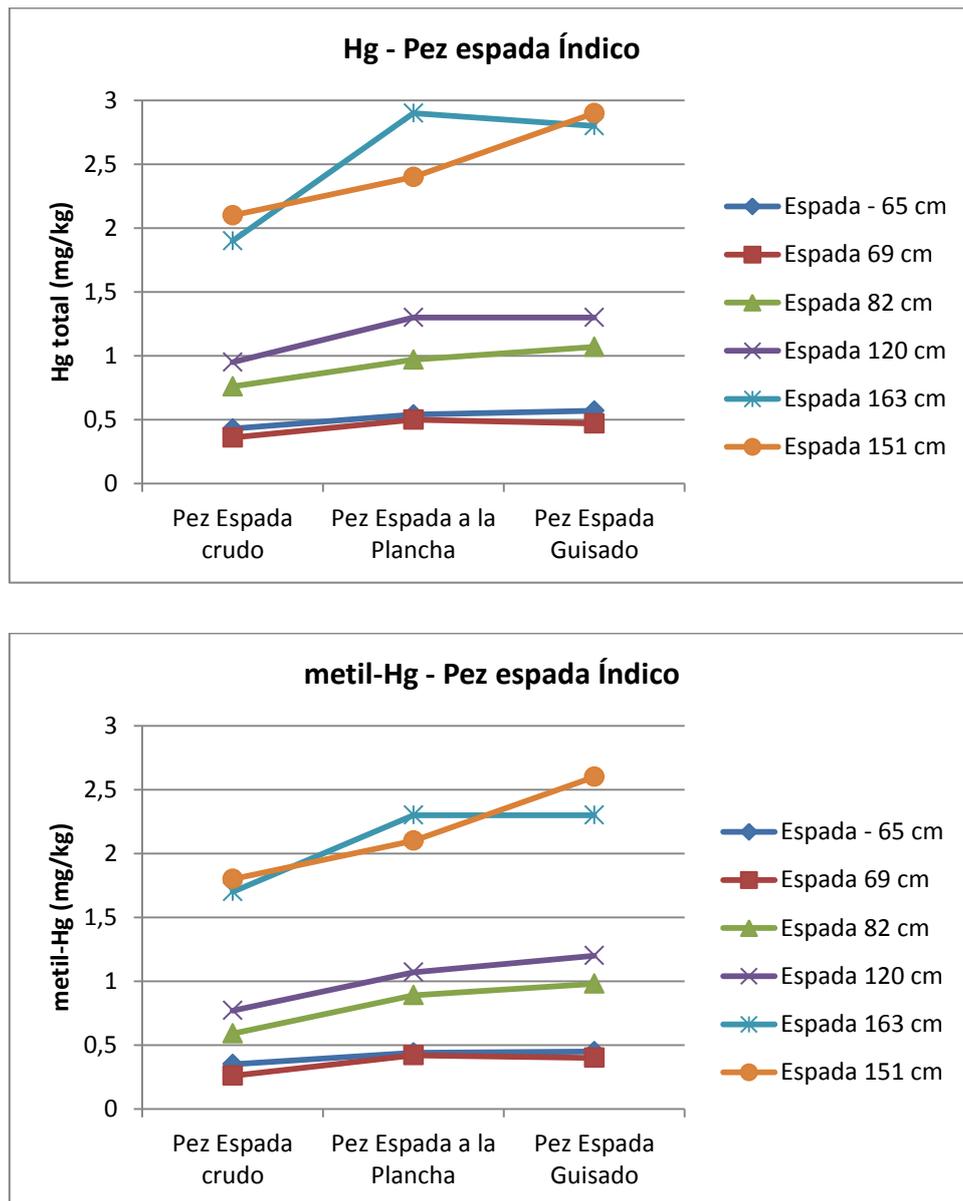


Figura 9: Efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metilmercurio en pez espada capturado en el Océano Índico.

En relación al pez espada, tanto procedente del Atlántico Norte como del Índico, lo primero que hay que destacar es que, por regla general, al aumentar el tamaño del ejemplar, incrementa, de forma considerable el contenido de Hg y MeHg. En las figuras 8 y 9, se puede observar que, tamaños inferiores a un metro presentan niveles muy bajos de los contaminantes, entre 0.5 y 1 mg/Kg, mientras que, salvo algún caso excepcional, a medida que aumenta el tamaño del pez, también se ve aumentado de forma significativa el contenido en Hg y MeHg, alcanzando en algunos casos concentraciones de 2 mg/Kg tras el cocinado. Además, hay una tendencia a incrementar el contenido de dichos metales pesados tras el cocinado del pescado; observando valores cercanos a los 3 mg/Kg en un pez espada de 151 cm, procedente del Océano Índico.

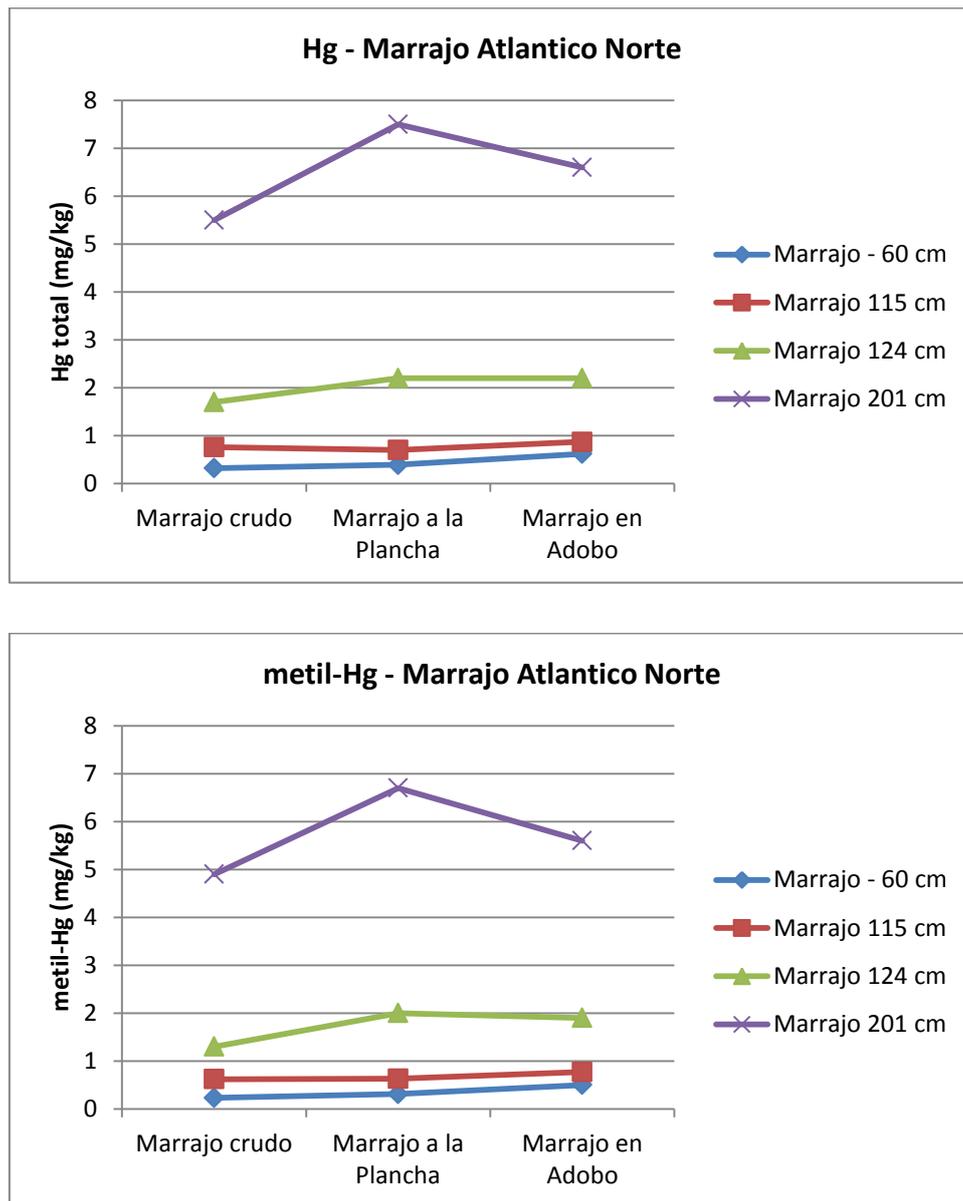


Figura 10: Efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metilmercurio en Marrajo capturado en el Atlántico Norte.

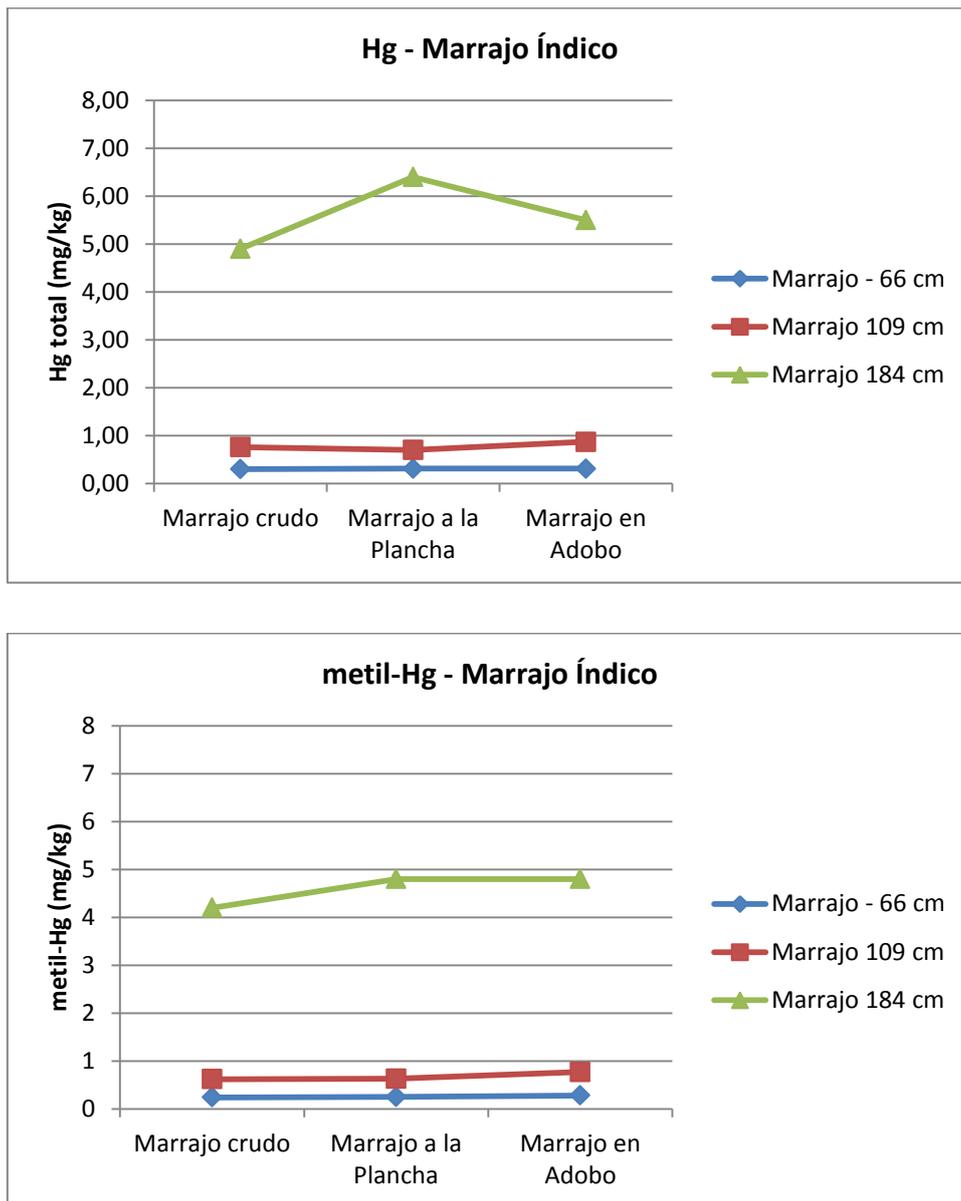


Figura 11: Efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metilmercurio en marrajo capturado en el Océano Índico.

En las figuras 10 y 11, se puede observar el contenido de Hg y MeHg en marrajo procedente del Atlántico Norte y del Índico. Resalta lo comentado anteriormente para el pez espada, ya que al aumentar el tamaño del ejemplar, incrementa, de forma considerable el contenido en metales. Cuando el tamaño del pez es inferior próximo a un metro los niveles de los contaminantes, son bastante bajos entre 0.5 y 1 mg/Kg, y en estos casos no se aprecia un efecto del cocinado. Por el contrario, cuando el pez alcanza mayor tamaño, los contenidos de Hg y MeHg aumentan de forma drástica, alcanzando en algún caso valores cercanos a los 5 mg/Kg de Hg o MeHg. Por otro lado, en estos ejemplares sí se aprecia un incremento en las concentraciones tóxicas tras el cocinado, superando en algún caso los 7 mg/Kg de Hg total.

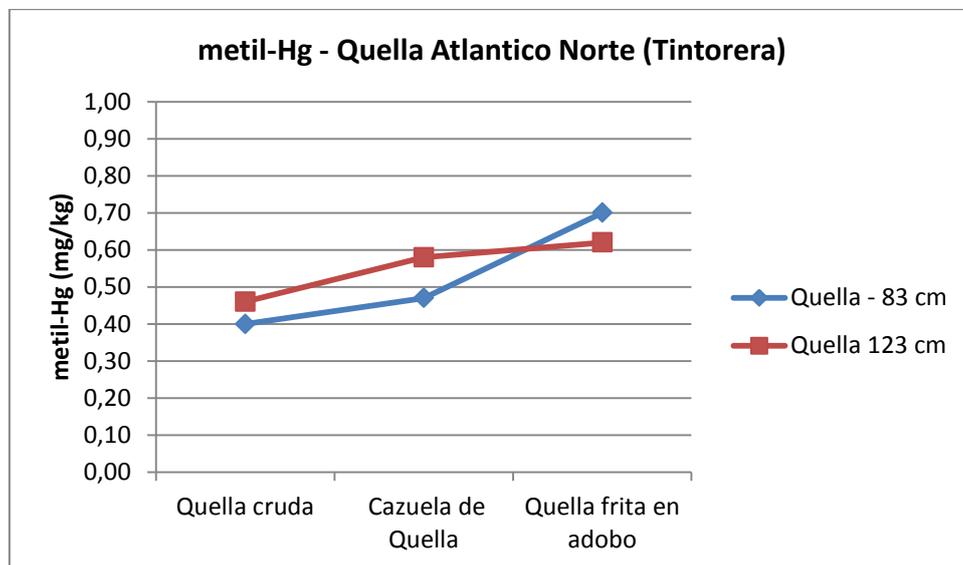
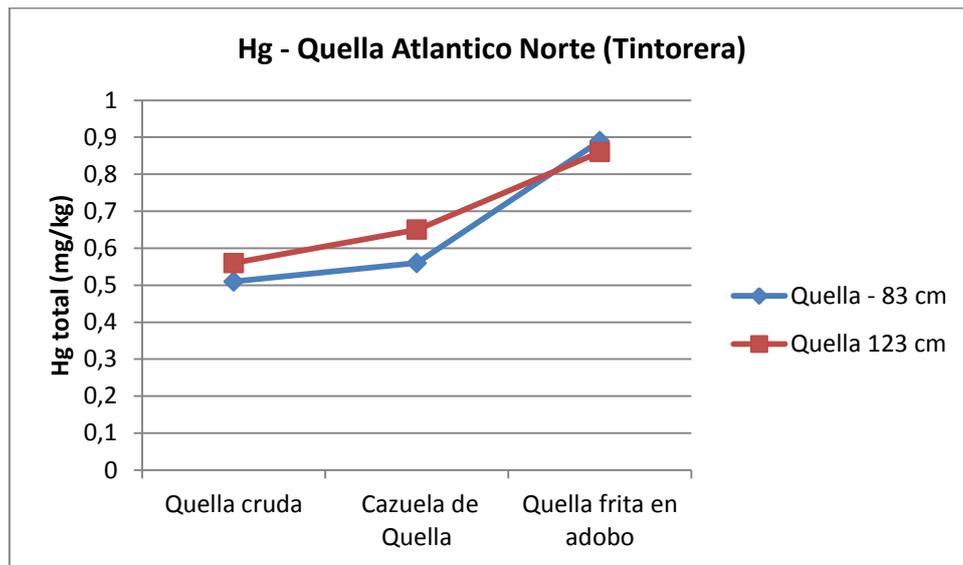


Figura 12: Efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metilmercurio en quella capturada en el Atlántico Norte.

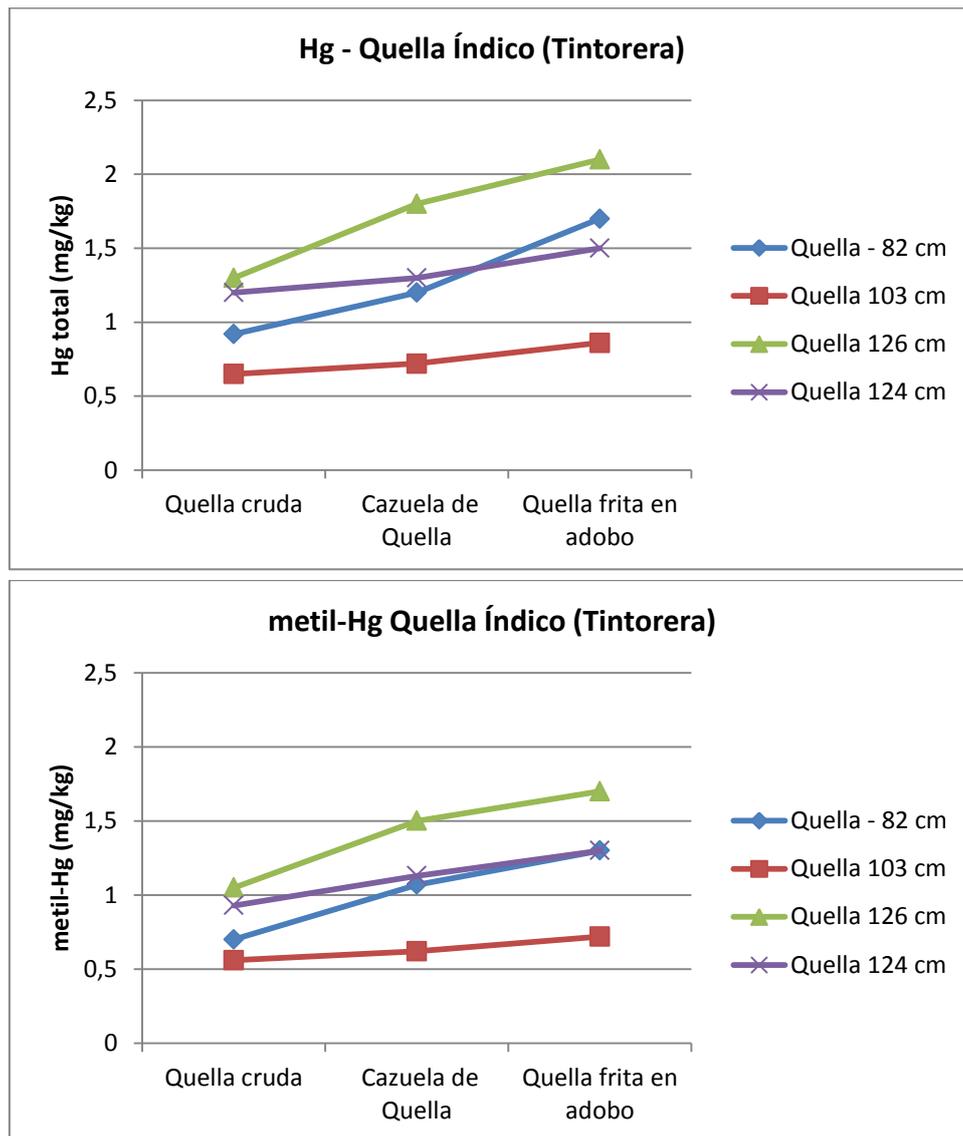


Figura 13: Efecto del cocinado sobre la concentración de mercurio y metilmercurio en quella capturada en el Océano Índico.

En la quella tanto procedente del Atlántico Norte como del Índico, al aumentar el tamaño del ejemplar, se incrementa el contenido de Hg y MeHg, como sucede en el pez espada y marrajo. En las figuras 12 y 13, se puede observar que, tamaños inferiores a un metro presentan niveles por debajo del límite máximo permitido de mercurio total, 1 mg/Kg, mientras que en las muestras procedentes del Índico, los valores de estos contaminantes son superiores en ejemplares del mismo tamaño, superando el límite máximo los mayores de 1 m de longitud. Además, al igual que se vio con el pez espada y el marrajo, hay una tendencia a incrementar el contenido de dichos metales pesados tras el cocinado del pescado, en particular con la receta de quella frita en adobo, tras la cual se observan aumentos de casi el 50% con respecto al pescado crudo.

2.3. RESULTADOS DE MERCURIO, METILMERCURIO Y SELENIO.

2.3.1. Relación Metil-Hg:Hg total en muestras crudas.

En la Tabla 2, se recogen los valores obtenidos en las muestras crudas de pez espada, marrajo y quella, de mercurio total, metilmercurio, el porcentaje que representa el metilmercurio respecto al mercurio total y el selenio.

Tabla 2: Concentración de Hg, metil-Hg y ratio metil-Hg:Hg total obtenidos en las muestras crudas de pez espada, marrajo y quella.

ESPECIE	TALLA	ZONA	PESO (kg)	TALLA LH (cm)	Hg (mg/kg)	metil-Hg (mg/kg)	% Me-Hg/Hg	Selenio (mg/kg)		
Pez Espada crudo	<10 kg	ATLÁNTIC O NORTE	7,2	68	0,39	0,28	71,8	0,32		
	10-30 kg		11,5	83	0,69	0,56	81,2	0,57		
	30-50 kg		45	121	1,8	1,3	72,2	0,76		
	50-100 kg		90	145	0,92	0,78	84,8	0,40		
	>100 kg		123	166	1,9	1,5	78,9	0,51		
	<10 kg	ÍNDICO	6,5	65	0,43	0,35	81,4	0,66		
			8,5	69	0,36	0,26	72,2	0,59		
	10-30 kg		12	82	0,76	0,59	77,6	0,61		
	30-50 kg		44	120	0,95	0,77	81,1	0,78		
	50-100 kg		87	163	1,9	1,7	89,5	1,37		
Marrajo crudo		ATLÁNTIC O NORTE	92	151	2,1	1,8	85,7	0,75		
	<10 kg		5	60	0,32	0,23	71,9	0,21		
	10-30 kg		29	115	0,76	0,62	81,6	0,33		
	30-50 kg		43	124	1,7	1,3	76,5	0,30		
	>100 kg		150	201	5,5	4,9	89,1	0,29		
		ÍNDICO	<10 kg	5,5	66	0,30	0,24	80,0	0,37	
	10-30 kg		28	109	2,6	2,0	76,9	0,37		
	>100 kg		145	184	4,9	4,2	85,7	0,45		
	Quella cruda		<7 kg	ATLÁNTIC O NORTE	3,5	83	0,51	0,40	78,4	0,26
			12-20 kg		17	123	0,56	0,46	82,1	0,19
<7 kg		ÍNDICO	5	82	0,92	0,7	76,1	0,49		
7-12 kg			11	103	0,65	0,56	86,2	0,36		
12-20 kg			16	126	1,3	1,05	80,8	0,42		
			18	124	1,2	0,93	77,5	0,33		

El porcentaje de metil mercurio con respecto al mercurio total presente en los ejemplares analizados se encuentra en el rango 71,8 – 89,5%, como se puede observar en la tabla 2. A la vista de los datos, se puede concluir que en promedio, un 80% del mercurio total presente en pez espada, marrajo y quella está en forma de metil mercurio. En los ejemplares de pez espada y marrajo con peso en torno a 90 kg y superior (n = 6), los valores de metil mercurio con respecto al mercurio total son superiores a la media, entre 85 y 89,5%, excepto una muestra (pez espada del Atlántico Norte, de 123 kg), que presenta un valor más cercano a la media. Solamente 1 ejemplar de quella (n = 6) presenta un valor superior a 80%, siendo el metil mercurio un 86% del mercurio total.

2.3.2. Relación Metil-Hg:Hg total en muestras cocinadas.

Una vez realizados los análisis en las muestras cocinadas de pez espada, marrajo y quella, se calcularon los valores de porcentaje que representa el metilmercurio respecto al mercurio total. Los resultados se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentración de Hg, metil-Hg y relación metil-Hg:Hg total obtenidos en las muestras cocinadas de pez espada, marrajo y quella. La “receta 1” corresponde a: pez espada y marrajo a la plancha, y cazuela de quella; la “receta 2” corresponde a: pez espada guisado, marrajo en adobo y quella frita en adobo.

ESPECIE	ZONA	PESO (kg)	COCINADOS - RECETA 1			COCINADOS - RECETA 2		
			Hg (mg/kg)	metil-Hg (mg/kg)	% Me-Hg/Hg	Hg (mg/kg)	metil-Hg (mg/kg)	% Me-Hg/Hg
Pez Espada	ATLÁNTICO NORTE	7,2	0,53	0,4	75,5	0,55	0,46	83,6
		11,5	0,97	0,85	87,6	1,07	0,95	88,8
		45	2,4	2,1	87,5	2,5	2,2	88,0
		90	1,10	0,99	90,0	1,3	1,01	77,7
		123	2,0	1,8	90,0	2,5	2,2	88,0
	ÍNDICO	6,5	0,54	0,44	81,5	0,57	0,45	78,9
		8,5	0,50	0,42	84,0	0,47	0,40	85,1
		12	0,97	0,89	91,8	1,07	0,98	91,6
		44	1,3	1,07	82,3	1,3	1,2	92,3
		87	2,9	2,3	79,3	2,8	2,3	82,1
Marrajo	ATLÁNTICO NORTE	92	2,4	2,1	87,5	2,9	2,6	89,7
		5	0,39	0,31	79,5	0,62	0,5	80,6
		29	0,7	0,63	90,0	0,87	0,77	88,5
	ÍNDICO	43	2,2	2	90,9	2,2	1,9	86,4
		150	7,5	6,7	89,3	6,6	5,6	84,8
		5,5	0,31	0,25	80,6	0,31	0,28	90,3
		28	3	2,6	86,7	3	2,7	90,0
Quella	ATLÁNTICO NORTE	145	6,4	4,8	75,0	5,5	4,8	87,3
		3,5	0,56	0,47	83,9	0,89	0,7	78,7
	ÍNDICO	17	0,65	0,58	89,2	0,86	0,62	72,1
		5	1,2	1,07	89,2	1,7	1,3	76,5
		11	0,72	0,62	86,1	0,86	0,72	83,7
		16	1,8	1,5	83,3	2,1	1,7	81,0
18	1,3	1,13	86,9	1,5	1,3	86,7		

El porcentaje de metil mercurio con respecto al mercurio total presente en las muestras cocinadas de los ejemplares analizados se encuentra en el rango 72,1 – 92,3%; en promedio, un 85% del mercurio total presente en pez espada, marrajo y quella cocinados está en forma de metil mercurio.

2.3.3. Relación Hg total: selenio en muestras crudas y cocinadas.

Los datos de mercurio total y selenio (en mg/kg) en pez espada crudo se representan en la Figura 14; los datos correspondientes a marrajo y quella crudos, en la Figura 15:

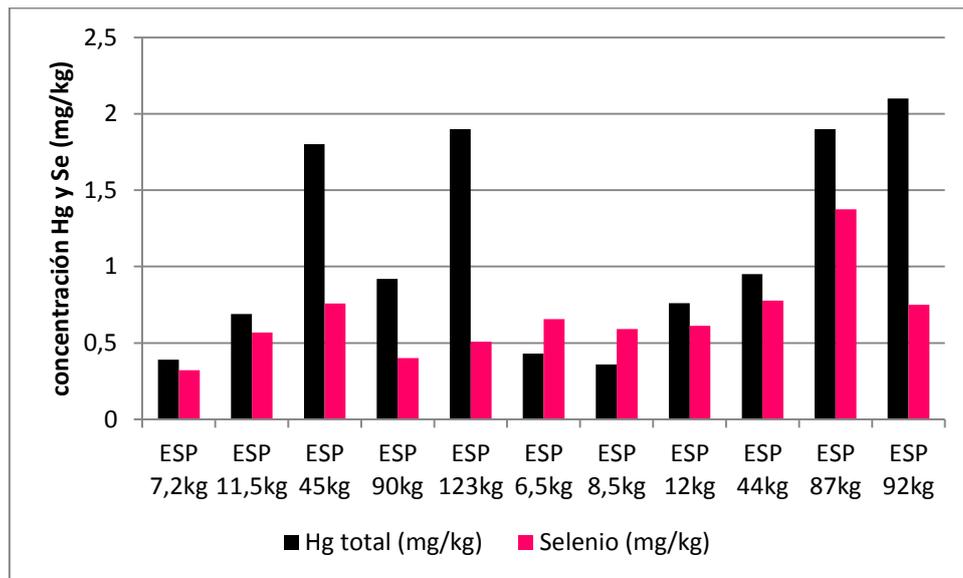


Figura 14: Valores de concentración de mercurio total y selenio en espada (ESP), obtenidos en la materia prima, pescado crudo.

En el pez espada, en todos los casos se aprecia mayor concentración de Hg que de Se, encontrando según los ejemplares mayores o menores diferencias.

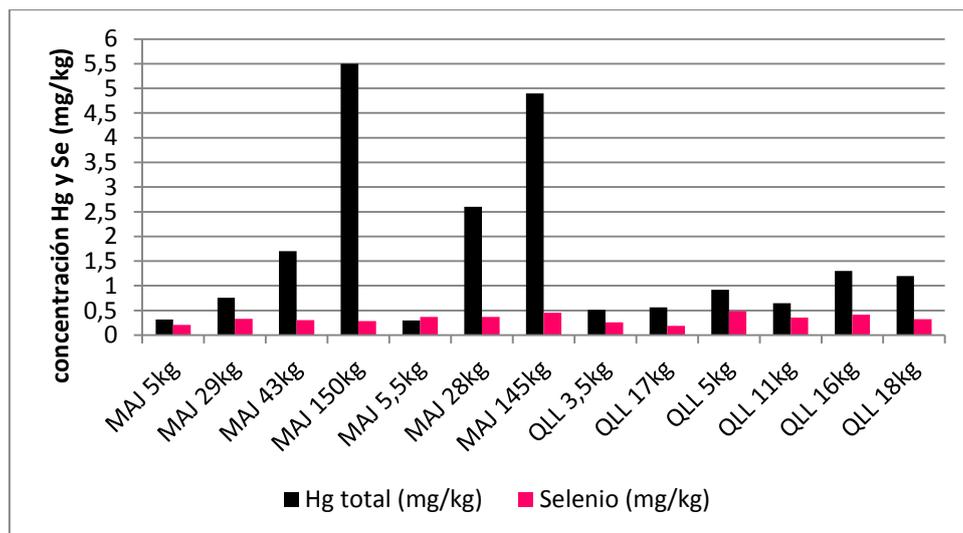


Figura 15: Valores de concentración de mercurio total y selenio en marrajo (MAJ) y quella (QLL), obtenidos en la materia prima, pescado crudo.

Lo mismo que ocurre en espada, salvo en un ejemplar (5,5 Kg) en todos los casos se aprecia mayor concentración de Hg que de Se (figura 14). Es destacable el menor valor de selenio que se encuentra en las muestras de marrajo y quella en comparación con el pez espada. En ningún caso se supera el valor de 0,5 mg/kg de Se, siendo los ejemplares de mayor tamaño de estas especies las que presentan los valores más elevados de mercurio (Figura 15). En pez espada, los valores de Se se encuentran en el rango de 0,5 - 1 mg/kg en prácticamente todas las muestras.

En el caso de muestras cocinadas, se realizaron los análisis de selenio en las muestras que se consideraron de mayor interés por presentar mayores concentraciones de mercurio. En la

Figura 16 se representan los datos de mercurio total y selenio en cada muestra de espada cocinada de las 2 formas:

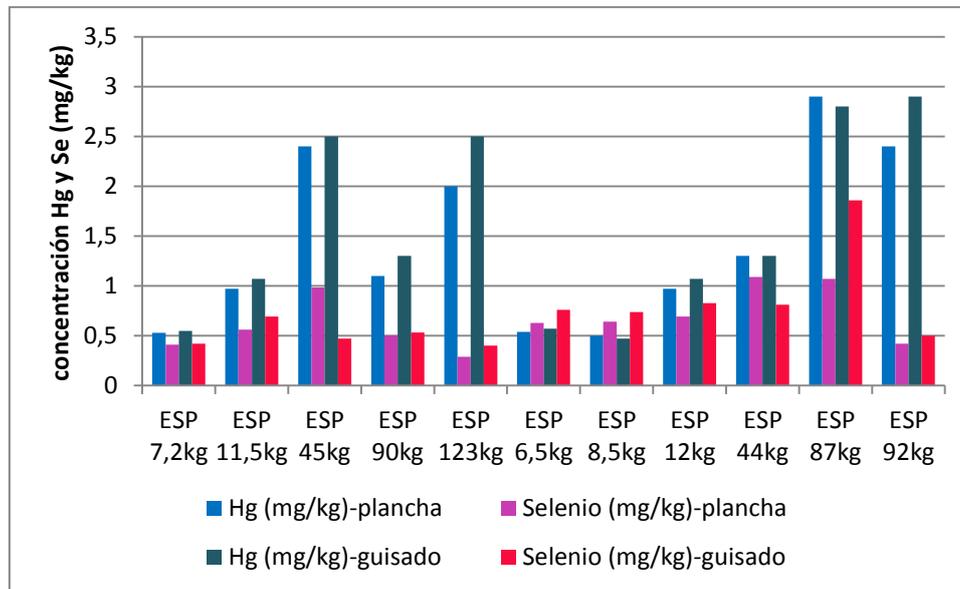


Figura 16: Valores de concentración de mercurio total y selenio en espada (ESP), obtenidos en las muestras cocinadas mediante 2 recetas: a la plancha y guisado.

Apenas se aprecian diferencias en las concentraciones de mercurio y selenio entre los dos tipos de cocinado. El selenio se mantiene en el mismo rango que en las muestras crudas, de 0.5 a 1 en la mayor parte de las muestras, mientras que el mercurio, experimenta un aumento durante el cocinado, como ya se comentó anteriormente.

2.3.4. Efecto protector del selenio: índice HBV_{Se}

El selenio se incorpora al organismo principalmente a través de la alimentación; la forma más absorbible para el ser humano es la selenometionina (SeMet). Este micronutriente es un componente esencial de diferentes enzimas que participan en la protección antioxidante de las células¹. Estas funciones son indispensables, en especial en el cerebro; además, el selenio se liga a metales tóxicos reduciendo potencialmente su toxicidad. De hecho, se ha demostrado la formación de complejos de mercurio-selenio, plata-selenio y cadmio-selenio a través de la selenoproteína P del plasma².

La toxicidad del mercurio se debe en gran medida a su unión con los grupos sulfuro de las proteínas. El mercurio y el metilmercurio se unen de modo irreversible a las selenoenzimas,

¹ Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Romarís-Hortas, V.; Moscoso-Pérez, C.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Bermejo-Barrera, P.; Prada-Rodríguez, D. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 324-345.

² Berry MJ, Ralston NVC. Mercury toxicity and the mitigating role of selenium. *EcoHealth*. 2008;5:456-9

bloqueando su función: el efecto nocivo de la exposición a metilmercurio sobre las selenoenzimas se produce como resultado de la interacción Se-Hg, lo cual podría explicar el daño oxidativo que se atribuye al metilmercurio³, observándose toxicidad cuando existe un exceso molar de mercurio respecto al selenio en el tejido afectado².

Para simplificar la evaluación de riesgos del Hg y los beneficios del Se, se aplica actualmente una ecuación que relaciona las concentraciones molares de ambos elementos de la siguiente forma:

$$HBV_{Se} = (Se - Hg) / Se * (Se + Hg)$$

De este modo, en el pescado en el que se obtiene un valor negativo del índice HBV_{Se} , presenta un riesgo incrementado de efectos adversos en el desarrollo cognitivo de los niños. Por el contrario, valores positivos del índice HBV_{Se} , ofrecen una expectativa de resultados beneficios del consumo. La magnitud de los valores, sean positivos o negativos, indican los beneficios o riesgos relativos⁴.

A continuación, se muestran los valores del índice HBV_{Se} , obtenidos en cada una de las especies, reflejando su tamaño (peso en kg) y su procedencia (Atlántico o Índico):

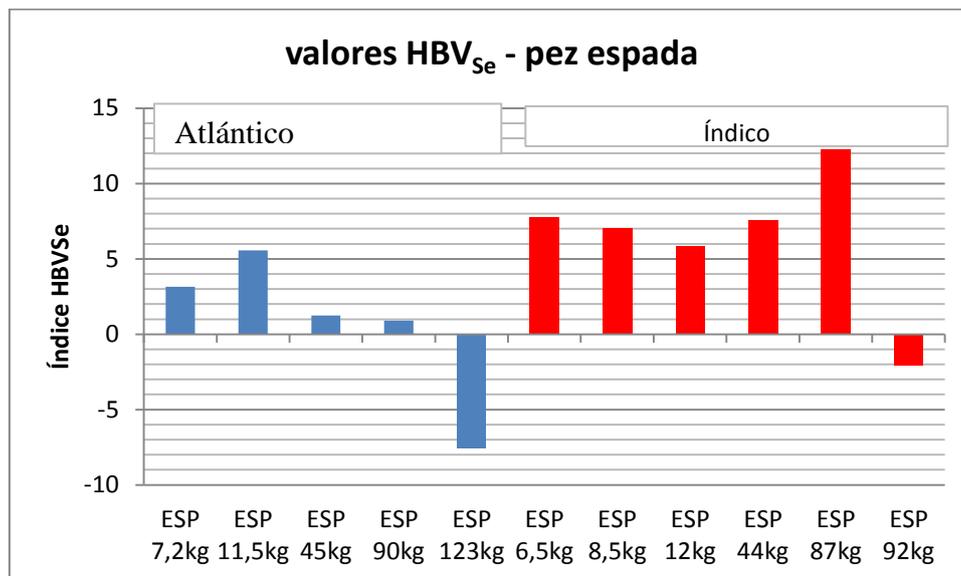


Figura 17: Valores del índice HBV_{Se} obtenidos en las muestras crudas de pez espada (ESP).

Como se puede observar en la figura 17, en los peces espada muestreados, solamente en los de mayor tamaño se obtiene un índice HBV_{Se} desfavorable, si bien incluso ejemplares de en

³ Burger, J.; Gochfeld, M.; Jeitner, C.; Donio, M.; Pittfield, T. Interspecific and intraspecific variation in selenium:Mercury molar ratios in saltwater fish from the aleutians: Potential protection on mercury toxicity by selenium. *Sci. Total Environ.* **2012**, *431*, 46-56.

⁴ Ralston, N.; Raymond, L.J. Selenium status and intake influences mercury exposure risk assessments. In *Selenium in the environment and human health*, Bañuelos, L.Y., Ed. Taylor & Francis Group: London, 2014; pp 203-205

torno a 100 kg presentan valores que no superan -10, siendo positivos los valores del índice en los especímenes menores de 90-100 kg aprox. tanto del Atlántico como del Índico.

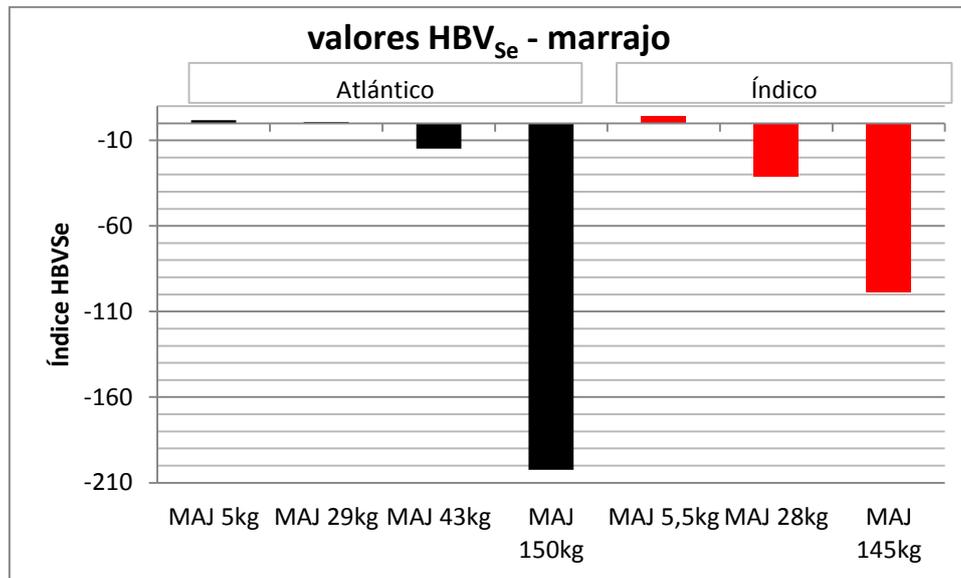


Figura 18: Valores del índice HBV_{Se} obtenidos en las muestras crudas de marrajo (MAJ).

En cuanto a los marrajos muestreados, los datos obtenidos se muestran en la figura 18. Solamente los de menor tamaño proporcionan valores no negativos del índice HBV_{Se}, siendo éste desfavorable, en los especímenes mayores de 30-40 kg procedentes del Atlántico, y a partir de tamaños en torno a 30 kg en ejemplares del Índico. El índice arroja un valor especialmente desfavorable en ejemplares de 140-150 kg, del orden de -100 a -200.

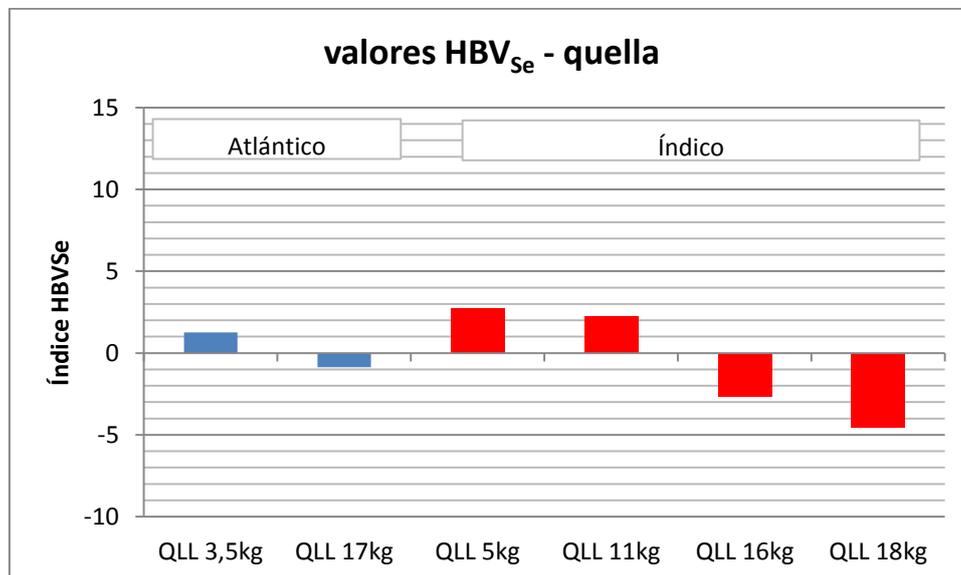


Figura 19: Valores del índice HBV_{Se} obtenidos en las muestras crudas de quella (QLL).

En quella, los especímenes muestran un balance negativo del índice HBV_{Se} en tamaños desde 16 kg, tanto del Atlántico como del Índico. La magnitud de los valores negativos no es muy alta, no sobrepasando el valor -5, aunque los tamaños muestreados en este caso no superan los 20 kg por ejemplar (figura 19).

Al realizar el cálculo del índice HBV_{Se} en las muestras cocinadas en las que se realizaron los análisis de selenio, se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación. En las gráficas se representa la evolución del índice HBV_{Se} en muestras crudas y cocinadas de manera que se puede ver la evolución de dicho índice con el cocinado.

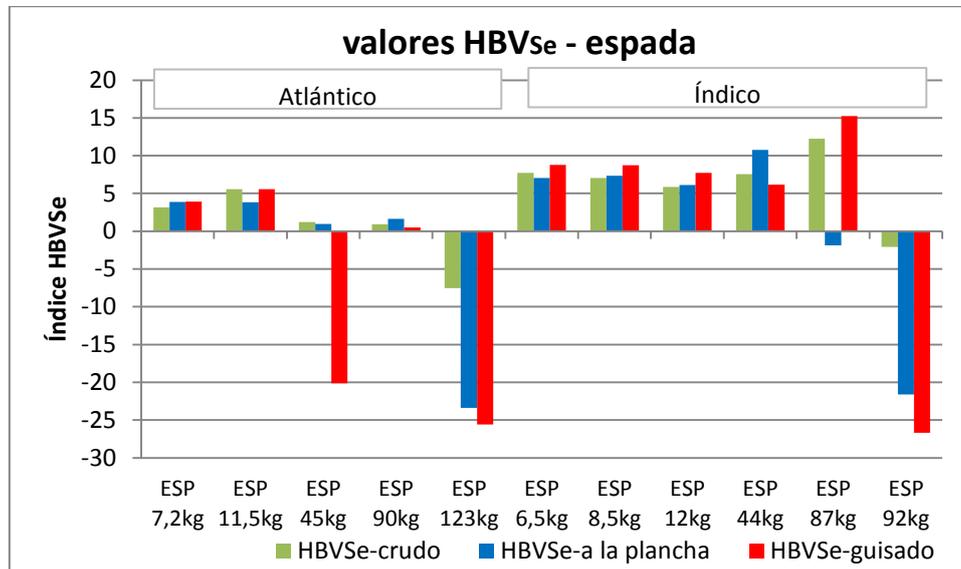


Figura 20: Valores del índice HBV_{Se} obtenidos en las muestras crudas y cocinadas de pez espada (ESP).

Los resultados de las muestras de pez espada cocinadas se muestran en la figura 20. Solamente en los pescados de mayor tamaño se obtiene un índice HBV_{Se} desfavorable, en ejemplares de en torno a 100 kg que en crudo presentaban valores que no superaban -10, tras el cocinado mediante las 2 recetas alcanzan valores más negativos, en torno a -25, siendo positivos los valores del índice en la mayoría de los especímenes menores de 90-100 kg aprox. tanto del Atlántico como del Índico.

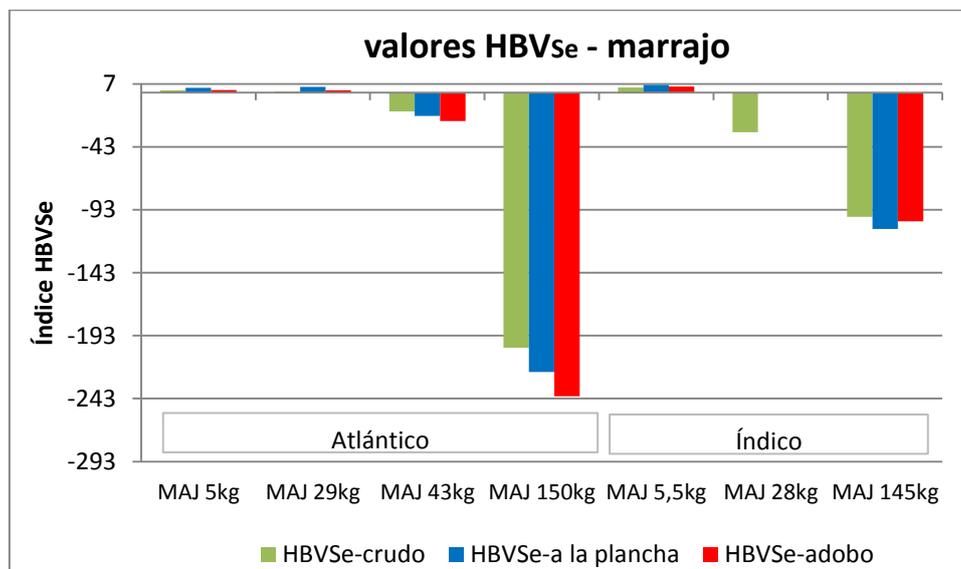


Figura 21: Valores del índice HBV_{Se} obtenidos en las muestras crudas y cocinadas de marrajo (MAJ).

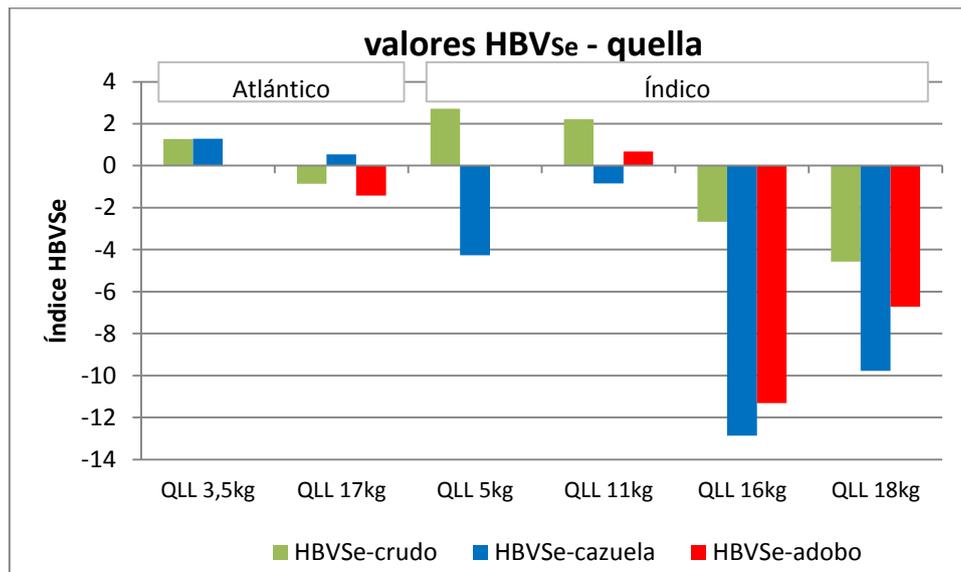


Figura 22: Valores del índice HBV_{se} obtenidos en las muestras crudas y cocinadas de quella (QLL).

En líneas generales, las muestras que presentan en crudo un índice HBV_{se} negativo, tras el cocinado, se mantiene negativo, aumentando su magnitud.

2.3.5. Conclusiones parciales:

Se puede concluir que en promedio, un 80% del mercurio total presente en pez espada, marrajo y quella está en forma de metil mercurio, siendo el rango 71,8 – 89,5%. En los ejemplares de pez espada y marrajo de mayor tamaño (> 90 kg) el metil mercurio es 85 - 89,5% del Hg total

En las muestras cocinadas, el porcentaje de metil mercurio con respecto al mercurio total se encuentra en el rango 72,1 – 92,3%; en promedio, un 85% del mercurio total presente en pez espada, marrajo y quella cocinados está en forma de metil mercurio.

Es destacable el bajo valor de selenio que se encuentra en las muestras de marrajo, en especial los ejemplares de mayor tamaño, que a su vez presentan los mayores valores de mercurio, y los índices HBV_{se} más desfavorables.

3. BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO*

3.1. Bioaccesibilidad *in vitro*.

La evaluación del riesgo o beneficio asociado a la ingesta de un compuesto se suele realizar asumiendo que la totalidad del compuesto presente en el alimento es absorbido. Sin embargo, distintos factores asociados al cocinado y digestión del alimento afectan al grado de absorción de dicho compuesto tras su ingestión, de manera que puede ocurrir que no todo el compuesto llegue a ser absorbido y alcance la circulación. Es por eso que nace la importancia de los conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

El término bioaccesibilidad se refiere a la fracción máxima que puede liberarse de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal. La fracción solubilizada, denominada fracción bioaccesible, está disponible para su absorción a través de la pared gástrica e intestinal y su posterior paso a la circulación. La bioaccesibilidad está afectada por distintos factores como el tipo de alimento y su composición, cambios durante el cocinado, o las condiciones del tracto gastrointestinal. Para la evaluación *in vitro* de la bioaccesibilidad, se someten las muestras de pescado a un proceso que simula la digestión humana. El protocolo de digestión está basado en el trabajo de Versantvoort y colaboradores⁵ y se describe a continuación.

En primer lugar es necesario preparar las soluciones que simulan la saliva, el jugo gástrico, el jugo duodenal y el jugo biliar, cuya composición se muestra en las tablas 4 y 5:

⁵ Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJ, Sips AJ: Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*. (2005); Jan;43(1):31-40.

Tabla 4: Composición de las soluciones sintéticas (orgánicas e inorgánicas) que componen la saliva y el jugo gástrico (Versantvoort et al., 2005).

	Saliva	Jugo gástrico
Solución inorgánica	10 ml KCl 89.6 g/l	15.7 ml NaCl 175.3 g/l
	10 ml KSCN 20 g/l	3.0 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/l
	10 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/l	9.2 ml KCl 89.6 g/l
	10 ml NaSO ₄ 57 g/l	18 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2 g/l
	1.7 ml NaCl 175.3 g/l	10 ml NH ₄ Cl 30.6 g/l
	20 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l	6.5 ml HCl 37 % g/g
Solución orgánica	8 ml urea 25 g/l	10 ml glucosa 65 g/l
		10 ml ácido glucurónico 2 g/l
		3.4 ml urea 25 g/l
		10 ml Hidrocloruro de glucosamina 33 g/l
Agregar a la mezcla de la solución orgánica e inorgánica	290 mg α-amilasa	1 g BSA
	15 mg ácido úrico	2.5 g pepsina
	25 mg mucina	3 g mucina
pH	6.8 ± 0.2	1.30 ± 0.02

Tabla 5: Composición de las soluciones sintéticas (orgánicas e inorgánicas) que componen el jugo duodenal y el jugo biliar (Versantvoort et al., 2005).

	Jugo duodenal	Jugo biliar
Solución inorgánica	40 ml NaCl 175.3 g/l	30 ml NaCl 175.3 g/l
	40 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l	68.3 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l
	10 ml KH ₂ PO ₄ 8 g/l	4.2 ml KCl 89.6 g/l
	6.3 ml KCl 89.6 g/l	150 µl HCl 37 % g/g
	10 ml MgCl ₂ 5 g/l	
	180 µl HCl 37 % g/g	
Solución orgánica	4 ml urea 25 g/l	10 ml urea 25 g/l
Agregar a la mezcla de la solución orgánica e inorgánica	9 ml CaCl ₂ .2H ₂ O 22.2 g/l	10 ml CaCl ₂ .2H ₂ O 22.2 g/l
	1 g BSA	1.8 g BSA
	9 g pancreatina	30 g bilis
	1.5 g lipasa	
pH	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2

La mezcla de las soluciones inorgánicas, orgánicas y el resto de los compuestos se enrasan a 500 ml con agua destilada; el pH se ajusta con NaOH 6M o HCl 6M, según corresponda y se reparten en alícuotas manteniéndolos congelados.

Proceso de digestión *in vitro*

Se pesan 4.5 g de la muestra de atún en una bolsa con filtro, se tritura y homogeniza en el equipo Stomacher® durante 30 segundos.

Se añaden 6 ml de saliva, y se incuba a 37 °C durante 5 minutos en agitación a 55 rpm en un baño termostatzado.

Se añaden 12 ml de jugo gástrico y se incuba a 37 °C durante 2 horas en agitación a 55 rpm.

Se añaden 12 ml de jugo duodenal, 6 ml de jugo biliar y 2 ml de bicarbonato sódico 1M y se incuba a 37 °C durante 2 horas en agitación a 55 rpm.

Se recoge el líquido obtenido después de realizar las digestiones y se centrifuga 5 minutos a 2750g

Se recoge el sobrenadante, donde a priori, se encuentran los contaminantes objeto de estudio. Este sobrenadante se divide en dos fracciones, de las cuales una se somete a análisis directamente, para efectuar los cálculos de bioaccesibilidad, y la otra se emplea en los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* en modelos celulares. Teniendo en cuenta la elevada proporción de metilmercurio respecto del mercurio total se decidió analizar solo el mercurio total para la realización del cálculo de la bioaccesibilidad.

La fracción que se empleará a continuación en ensayos de biodisponibilidad sobre monocapas celulares, se somete a un calentamiento (4 minutos a 100 °C y luego enfriamiento en hielo durante 10 minutos) para desactivar las enzimas. Posteriormente se agrega glucosa 5 mM y HEPES 50 mM; se ajusta la osmolaridad a 300 mOsm/kg y el pH a 7.2 y se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 µm.



Figura 23: Muestras trituradas y homogenizadas antes de añadir la fracción de saliva. Equipo de stomacher utilizado para homogenizar la muestra.

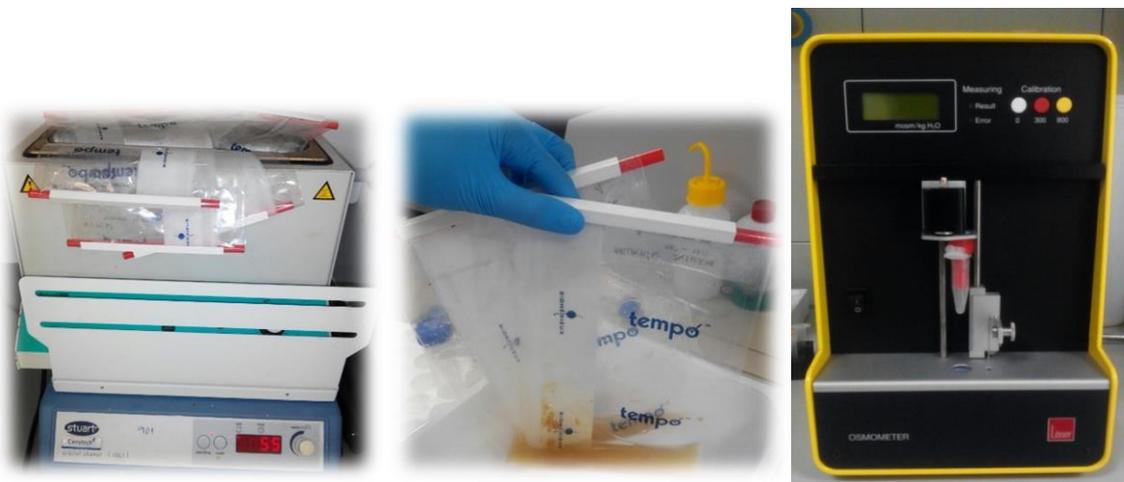


Figura 24: Baño con agitación empleado para realizar la digestión de las muestras; sobrenadante obtenido y osmómetro utilizado para ajustar la osmolaridad de las muestras.

3.1.1. Determinación de la bioaccesibilidad

Una vez terminada la digestión *in vitro* se analiza la concentración de metales presentes en el sobrenadante (en la alícuota no tratada), ya que suponen la fracción soluble y por tanto bioaccesible. El cálculo del porcentaje de bioaccesibilidad para cada contaminante se lleva a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Bioaccesibilidad} = \frac{\text{Hg } (\mu\text{g}) \text{ solubilizado después de la digestión}}{\text{Hg } (\mu\text{g}) \text{ presente en la muestra inicial}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se muestran a continuación. En general, los valores de bioaccesibilidad obtenidos son muy variables entre las distintas muestras analizadas, observándose en todos los casos una mayor bioaccesibilidad del selenio que del mercurio.

En el caso del pez espada, la biodisponibilidad del selenio fue cercana al 100%, mientras que la biodisponibilidad del mercurio fue del 10%. En las distintas muestras analizadas, la biodisponibilidad de mercurio más alta encontrada fue del 22.4% en una muestra de espada guisado. No se observan diferencias destacables en relación al tipo de preparación, tal y como recoge la figura 25.

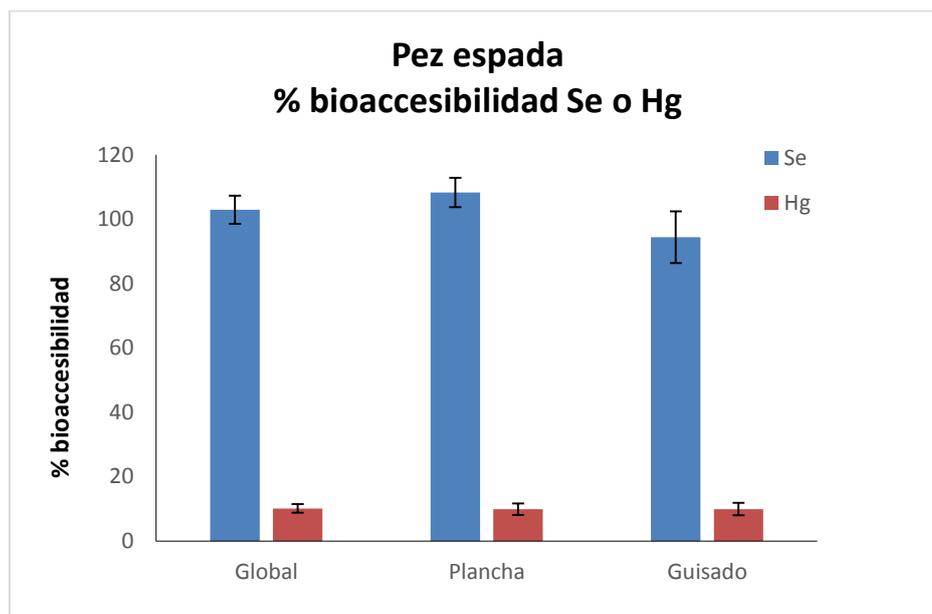


Figura 25: Porcentajes de bioaccesibilidad de selenio y mercurio obtenidos en pez espada cocinado (global) y con las dos recetas (a la plancha y guisado) representadas por separado.

En el caso del marrajo, la bioaccesibilidad del selenio es menor (83%) y la bioaccesibilidad del mercurio es mayor (15.8%) que las observada en el pez espada, como se observa en la figura 26., no apreciando diferencias asociadas al tipo de preparación. En las distintas muestras analizadas, la biodisponibilidad de mercurio más alta encontrada fue del 56.3% en una muestra de marrajo a la plancha.

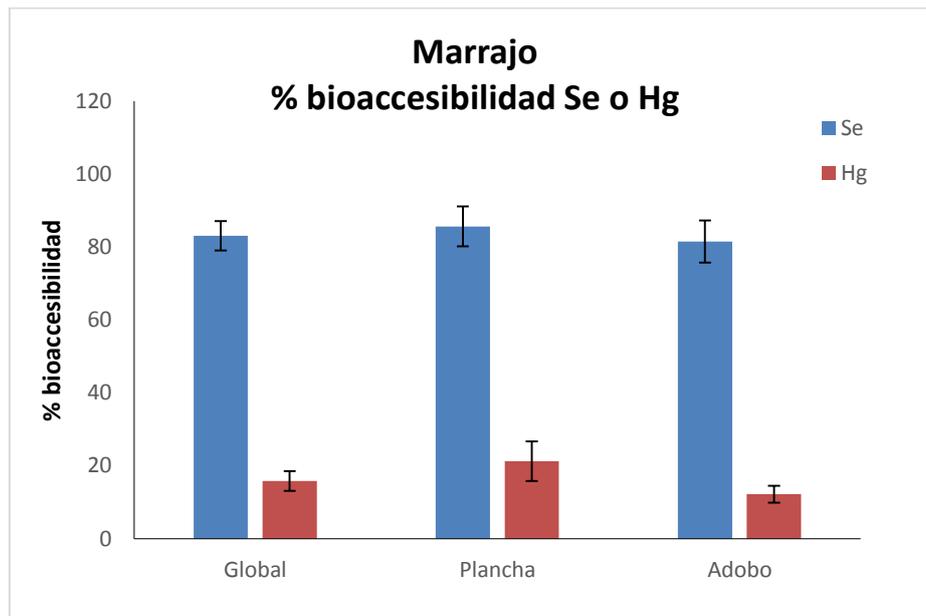


Figura 26: Porcentajes de bioaccesibilidad de selenio y mercurio obtenidos en marrajo cocinado (global) y con las dos recetas (a la plancha y en adobo) representadas por separado.

Por último, en la figura 27 se muestran los valores de bioaccesibilidad obtenidos en las muestras de tintorera, próximos al 100% en el caso del selenio, mientras que los de bioaccesibilidad de mercurio fueron del 20.9%, los más altos de las tres especies estudiadas. Las muestras preparadas a la cazuela dieron resultados de bioaccesibilidad de mercurio ligeramente superiores a las muestras fritas en adobo (26.6% y 14.1% respectivamente). En las distintas muestras analizadas, la bioaccesibilidad de mercurio más alta encontrada fue del 83% en una muestra de tintorera a la cazuela.

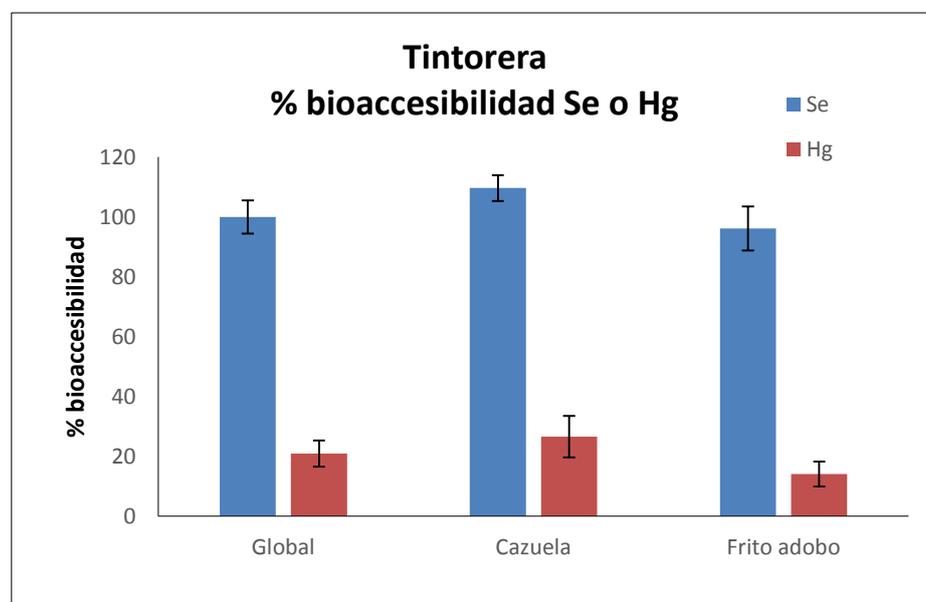


Figura 27: Porcentajes de bioaccesibilidad de selenio y mercurio obtenidos en tintorera cocinada (global) y con las dos recetas (a la cazuela y frito en adobo) representadas por separado.

3.2. Biodisponibilidad *in vitro*.

Tras el proceso de digestión, los compuestos bioaccesibles deben atravesar la pared intestinal para alcanzar la circulación sistémica. La biodisponibilidad depende de la digestión, de la absorción de los nutrientes por medio de los enterocitos intestinales y la disponibilidad de los mismos para las funciones metabólicas. La biodisponibilidad se considera como la fracción de un nutriente o fármaco que llega a la circulación sistémica tras su administración vía oral. Inicialmente se trabajó con un modelo celular basado en un monocultivo de Caco-2, un modelo procedente de carcinoma de colon que en cultivo da lugar a enterocitos.

Este modelo se cultivó en monocapa celular sobre placas de seis pocillos con membranas de 0,4 μm de poro y 30 mm de diámetro (Sistema Transwell). Este sistema permite el crecimiento del epitelio celular sobre una membrana de policarbonato que separa dos compartimentos, el superior o apical que simula la luz intestinal y el inferior o basal que simula la circulación sanguínea. Las células se siembran en el compartimento apical de las placas, a una densidad de 30×10^4 células/ml, excepto en un pocillo que se emplea como blanco. A partir del momento de la siembra, cada dos/tres días se retira el sobrenadante de las células y se adiciona medio de cultivo nuevo. Los cultivos se mantienen 14 días para permitir la diferenciación a enterocitos antes de realizar los experimentos de absorción. La comprobación de la formación completa del epitelio se verifica midiendo el valor de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) con un resistómetro Millicell-ERS. Consideramos adecuado para realizar los ensayos, un valor estable por encima de los 300 Ohms cm^2 .

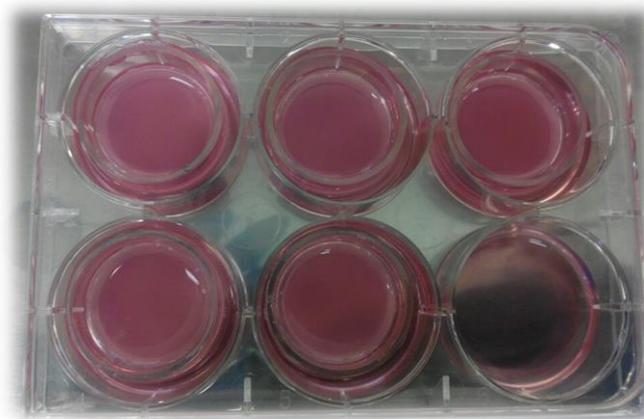


Figura 28: Sistema de cultivo celular con filtros sobre el cual se han añadido las muestras

3.2.1. Absorción de contaminantes por las células Caco-2

El transporte del Hg y MeHg a través de la monocapa celular se analizó en la dirección apical-basolateral en medio Hank's suplementado con HEPES 10 mM.

Se acondicionan las células con medio Hank's-HEPES durante 15 minutos. Se retira el medio Hank's-HEPES de la parte apical y se añade 1.5 ml del digerido. Los ensayos realizados con el digerido que se obtiene a partir de las muestras no dieron los resultados esperados, debido a que la concentración de metales presentes en el digerido no es lo suficientemente alta como para obtener concentraciones de mercurio en el medio basal medibles con la metodología disponible. Por ello se decidió continuar el trabajo con muestras de digeridos contaminados

artificialmente con los metales pesados a una concentración de 20 μM para obtener niveles cuantificables en el medio basal.

En el caso de cinéticas de absorción, es necesario reponer el medio basal que se retira para mantener las condiciones del experimento. Puesto que se añade medio basal sin metales, se produce un efecto de dilución sobre el medio basal restante que debe ser tenido en cuenta a la hora de procesar los datos. En las figuras 29 y 30 se observan cinéticas de absorción de 4 horas de exposición sobre el tejido celular (Caco-2). Este tiempo de tiempo de exposición de 4 horas, se escogió en base a bibliografía existente y a ensayos de toxicidad por mercurio a distintos tiempos y concentraciones (datos no mostrados). Los tiempos y concentraciones empleadas no tienen efectos tóxicos sobre los cultivos, ya que de tenerlos se podría afectar la integridad de la monocapa y dar lugar a una sobreestimación de la absorción.

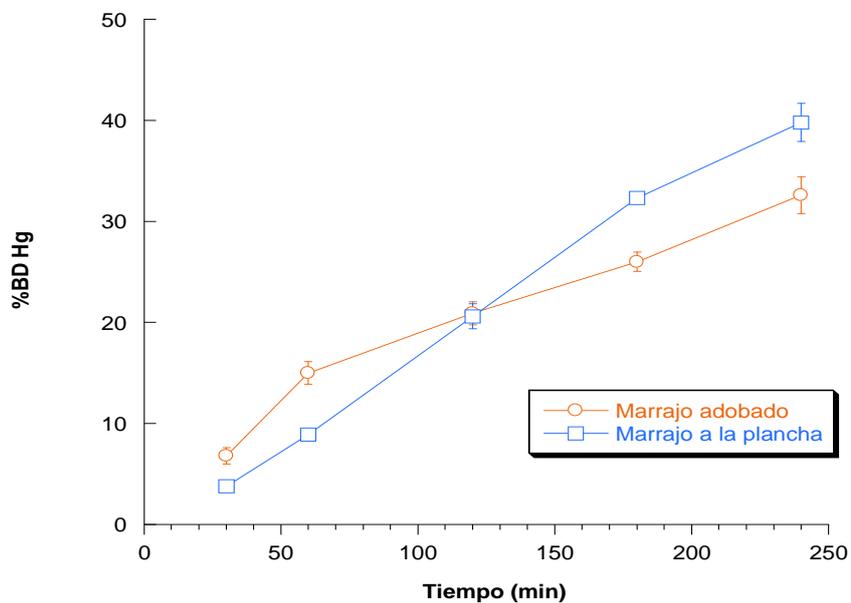


Figura 29: Biodisponibilidad de mercurio (%BD Hg) en marrajo *Isurus oxyrinchus* en base a la fracción bioaccesible.

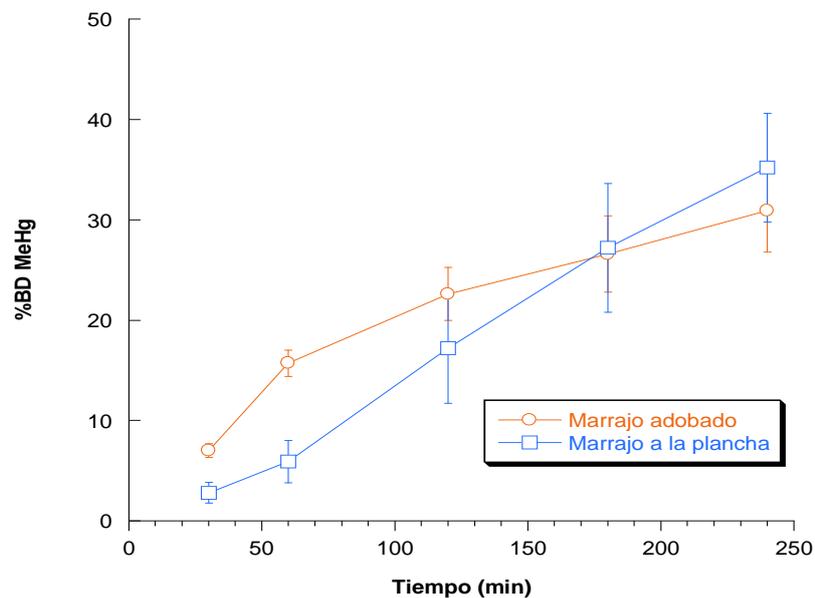


Figura 30: Biodisponibilidad de metilmercurio (%BD MeHg) en marrajo *Isurus oxyrinchus* en función a la fracción bioaccesible

Posteriormente se introdujo un modelo celular más complejo, que incorpora las células HT29-MTX, similares a células de goblet o caliciformes. Éstas proceden del colon y se diferencian en células secretoras de mucus. El uso de co-cultivos de Caco-2 y HT29 permite al modelo incorporar los dos tipos celulares más importantes en el epitelio intestinal; esto representa al epitelio intestinal humano de forma más precisa.

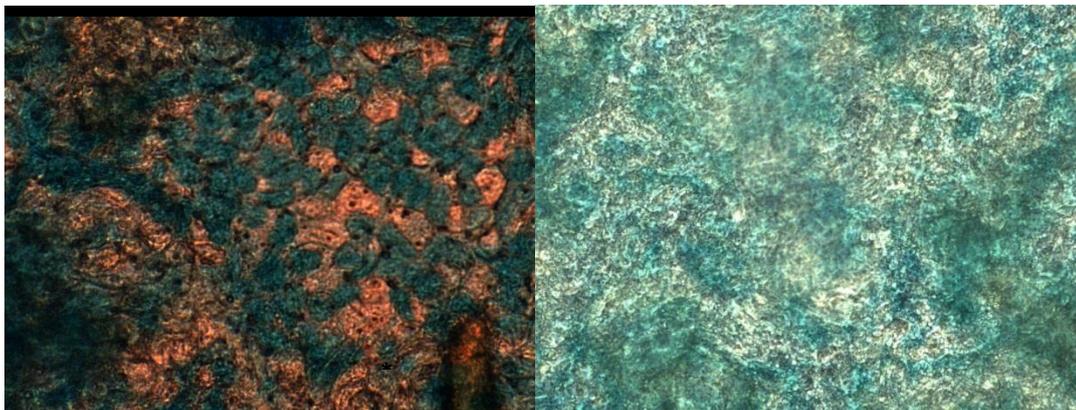


Figura 31: Tinción diferencial de un cocultivo con las células secretoras de mucus de color verde y las Caco 2 de color naranja o amarillo.

La inclusión de las células HT29 en la monocapa provoca un descenso en los valores de resistencia transepitelial comparado con los monocultivos de Caco-2. debido a una menor concentración de uniones fuertes (tight junctions) por la presencia de células HT29. En todo caso, en los cocultivos se alcanzan valores de TEER que garantizan la integridad de la monocapa, como se observa en la figura 32.

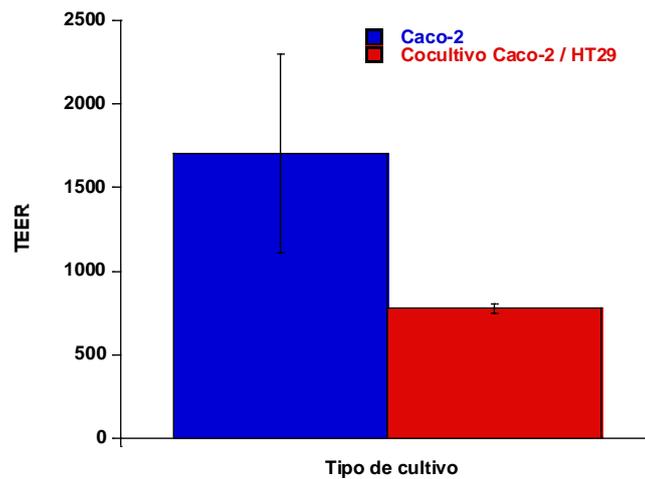


Figura 32: Comparación del TEER en monocapa de Caco-2 y cocultivo Caco-2 y HT29 realizados de manera simultánea.

3.2.2. Resultados de biodisponibilidad *in vitro*.

Los estudios de biodisponibilidad in-vitro se llevan a cabo con la utilización de un modelo celular que resulta muy robusto. A pesar de la tipología de placa (de 6 o 24 pocillos) y del porcentaje de líneas celulares empleadas, no se aprecian diferencias sustanciales en los resultados.

Se realizó un estudio en tres muestras independientes para conocer la capacidad que presenta el moco de absorber los distintos contaminantes, en este caso, dopando con una concentración de Hg de 5 μ M. En la figura 33 se observa que el mucus de las células caliciformes retiene un elevado porcentaje del Hg, alrededor del 25%.

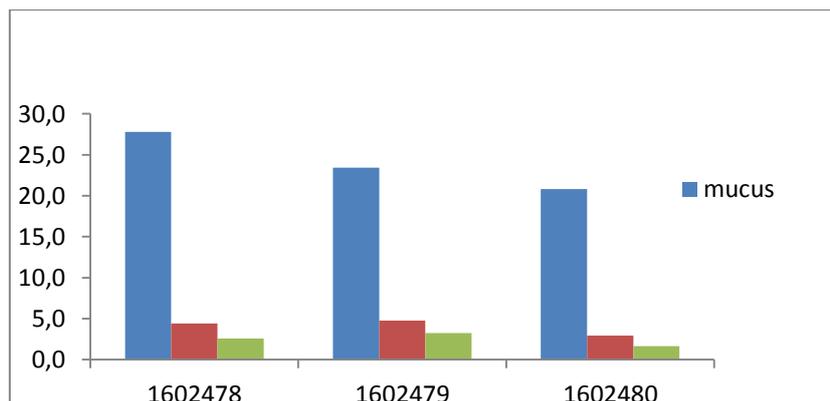


Figura 33: Porcentaje de absorción de Hg, contaminando con 5 μ M, en la parte correspondiente al mucus, retención en células o absorción.

Se puede notar una ligera diferencia entre la retención de Hg por medio del moco en los dos modelos de ensayos utilizados: 30 % HT-29 y 10 % HT-29, como se aprecia en la figura 34. La mayor cantidad de mucus producido por un superior número de células caliciformes HT-29 se relaciona con un ligero aumento en la retención de Hg. Sin embargo, estas pequeñas diferencias no son significativas.

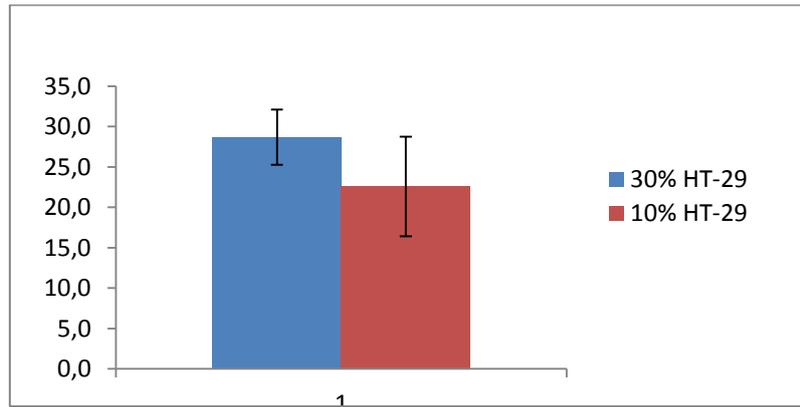


Figura 34: Porcentaje de Hg retenido en el mucus, en relación al porcentaje de células calciformes en el cocultivo.

Por ello, los estudios de biodisponibilidad se llevaron a cabo con un co-cultivo de células HT29: Caco2 en relación 30:70.

Inicialmente se contaminaron de forma artificial los extractos digeridos debido a la baja concentración de los metales una vez realizada la digestión y ajustada la osmolaridad para poder añadirse a las células. Por ello, para realizar los estudios de biodisponibilidad *in vitro*, las muestras se doparon con cantidades diferentes de Hg o MeHg (40-5 μ M) y Se (20-4 μ M).

Cuando se añadieron estos compuestos sobre el digerido, los porcentajes de absorción resultaban muy inferiores a lo esperado, por lo que se decidió seguir los estudios con muestras que tuvieran estos metales de forma natural, aunque la concentración de éstos fuese demasiado baja. Cuando se llevaron a cabo estos análisis en muestras sin dopar, se observó que la mayoría de ellas tenían unos niveles de Se y Hg total muy cercanos al LOQ del método, lo que no nos permitía cuantificar de forma precisa los valores obtenidos. Debido a ello, se realizaron los cálculos de biodisponibilidad con aquellos valores que superaban el LOQ, lo que en caso de muestras no dopadas solo ocurrió para los resultados de selenio.

En la figura 35 se pueden observar los porcentajes de absorción de Hg y Se en el marrajo, tanto cocinado a la plancha, como en adobo. Los porcentajes de absorción son superiores para el Se, obteniendo valores alrededor del 50 %, mientras que en el caso del Hg, se observan porcentajes inferiores al 50 %. No se aprecian diferencias en los porcentajes de biodisponibilidad con respecto a la forma de preparación culinaria.

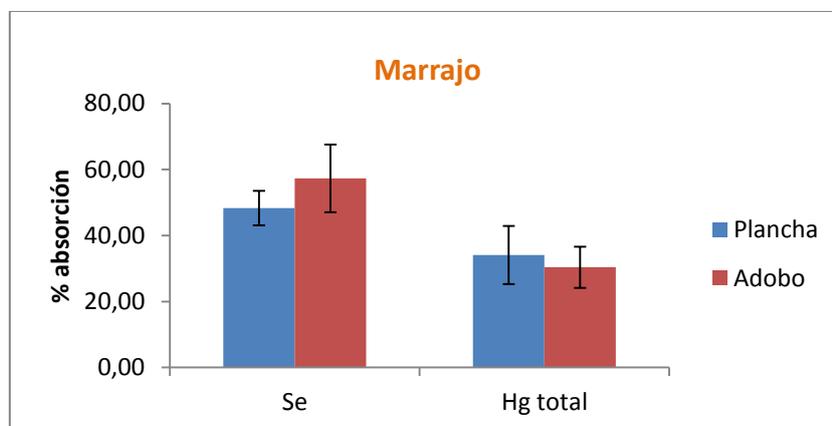


Figura 35: Porcentajes de absorción del Hg o del Se en el marrajo mediante el cocultivo de células Caco-2 y HT29

En la tintorera destacan unos porcentajes de biodisponibilidad para el Se muy elevados, alrededor del 80 %, tanto mediante la preparación a la cazuela como frita. Por el contrario, la absorción del Hg es muy inferior, cercana al 50 %, sin mostrar diferencias con respecto a la forma de preparación culinaria, como se observa en la figura 36.

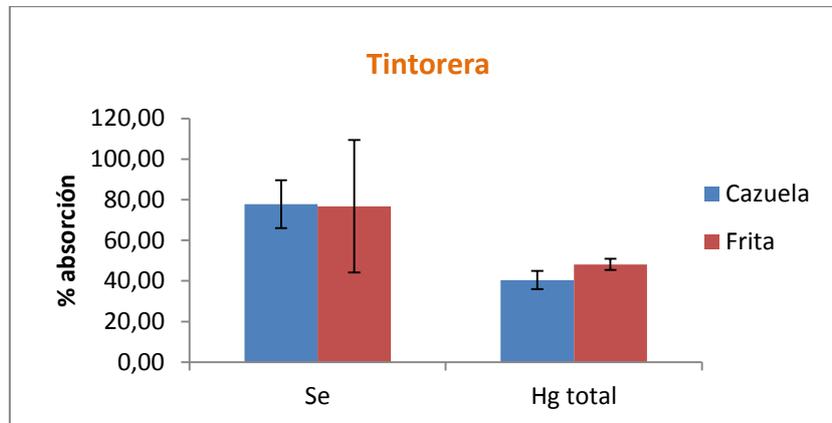


Figura 36: Porcentajes de absorción del Hg o del Se en la tintorera mediante el cocultivo de células Caco-2 y HT29

Por último, en el pez espada se aprecia un comportamiento completamente distinto al de los anteriores pescados ya que el porcentaje de absorción del Se es inferior, alrededor de un 30 %, al del Hg, superior a un 40 %. No se aprecian diferencias con respecto a la forma de preparación culinaria, como se observa en la figura 37.

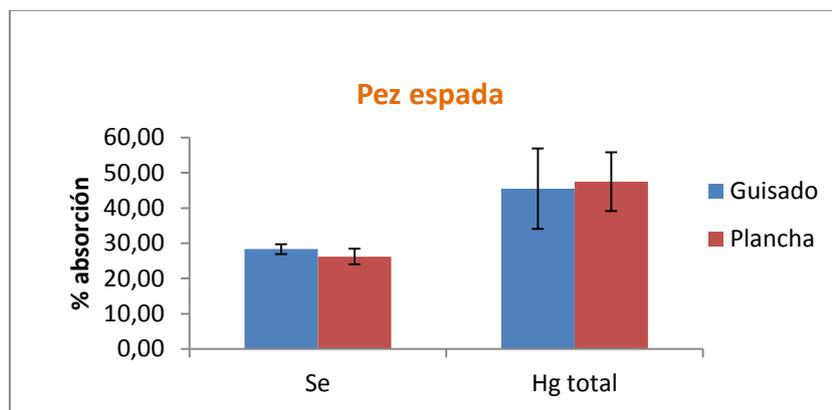


Figura 37: Porcentajes de absorción del Hg o del Se en el pez espada mediante el cocultivo de células Caco-2 y HT29.

3.2.3. Conclusiones parciales

En las muestras analizadas, la bioaccesibilidad *in vitro* resultó mayor para el selenio que para el mercurio en todos los casos, independientemente de la especie o la forma de preparación.

La bioaccesibilidad *in vitro* del mercurio en los pescados cocinados resultó ser ligeramente superior en marrajo que en pez espada, siendo la tintorera la especie que mostró mayor bioaccesibilidad *in vitro* de los tres.

La bioaccesibilidad *in vitro* del selenio en los pescados cocinados resultó ser inferior en marrajo que en pez espada y tintorera.

Por otra parte, en el modelo *in vitro* de absorción transepitelial en cocultivo Caco-2 y HT29, se encontró mucha variabilidad entre las distintas muestras ensayadas, en consonancia con el trabajo de otros autores.

La absorción del selenio fue mayor que la del mercurio en el caso del marrajo y la tintorera, mientras que las muestras de pez espada presentaron mayor absorción de mercurio que de selenio.

4. BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD *in vivo*

Se prepararon piensos con los pescados cocinados y se alimentó a animales de experimentación (ratas) para estudiar posteriormente la bioaccesibilidad y biodisponibilidad *in vivo* del Hg, así como la del elemento antagonista, el Selenio. Es decir, la cantidad de cada elemento que se absorbe a través del intestino y llega a la circulación sanguínea estando disponible para promover su acción en el organismo.

Con este fin, se seleccionaron porciones de distintos pescados cuyo contenido en Hg fue previamente determinado. Se cocinaron mediante las recetas que se aplicaron desde el inicio del estudio: pez espada cocinado a la plancha y guisado, marrajo cocinado a la plancha y en adobo, y quella cocinada a la cazuela y frita en adobo. Se utilizó un porcentaje de cada una de las preparaciones (entre 12 y 20%) para elaborar los piensos que fueron administrados a ratas de laboratorio, durante 3 días, al término de los cuales se obtuvieron las muestras de suero sanguíneo y heces.

Se procedió a la deshidratación y pulverización de las muestras de pescados cocinados para elaborar los piensos, incorporándolo al pienso estándar (SAFE A04, Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) y alimentar, de forma individual, ratas Sprague-Dawley alojadas en jaulas metabólicas (n = 3), según el convenio establecido entre el grupo de investigación GI-2122 de la Universidad de Santiago de Compostela y ANFACO-CECOPECA.

A lo largo del proyecto se realizaron un total de 80 muestras de pienso (a base de quella cocinada, n = 25; a base de marrajo cocinado, n = 27; a base de espada cocinado, n = 28). Cada una de estas muestras se ensayó *in vivo* por triplicado, dando lugar a 480 muestras biológicas en total (sueros sanguíneos y heces); se muestra la distribución de muestras en la tabla 6:

Tabla 6: Distribución de muestras de piensos y muestras biológicas originadas en el estudio *in vivo*.

Muestras estudio <i>in vivo</i>	Matrices analizadas	quella	marrajo	espada
elaboración con pescado cocinado	piensos	25	27	28
Muestras biológicas	Suero sanguíneo	75	81	84
	Heces	75	81	84
	Total	150	162	168
Total (estudio <i>in vivo</i>)	560	175	189	196

Se representan a continuación los datos de Hg, metil-Hg y Se, y el cálculo del índice HBVSe, obtenidos desde el comienzo del estudio, en los piensos elaborados con dichos pescados cocinados mediante las 2 recetas seleccionadas para cada uno, y finalmente, los datos

obtenidos en las muestras biológicas obtenidas de los roedores alimentados con dichos piensos.

4.1. Pienso control

Se realizó un ensayo control utilizando el pienso estándar (control) que se administra a las ratas, sin adición de pescado, y alimentando 3 ratas, organismos que sirvieron como control, y cuyos valores finales de Hg y Se en suero sanguíneo se representan en las gráficas junto con el de los animales alimentados con piensos adicionados con los pescados del estudio. En este pienso, el valor de Hg se encuentra por debajo del límite de detección (0,03 mg/kg), siendo el valor de Se de 0.133 mg/kg. El valor del índice HBV_{Se} del pienso estándar (control) que se administra a las ratas, sin adición de pescado, y tomando el valor de "Hg hipotético" del límite de detección, 0,03 mg/kg, sería $HBV_{Se} = 1,7$.

Por el contrario, en todos los casos en los que se prepararon los piensos adicionando los pescados del estudio sí fue detectable el Hg, debido a su presencia en los mismos. Se presentan los resultados a continuación, organizados por especie.

4.2. Quella

4.2.1. Piensos elaborados con quella cocinada

Durante todo el estudio, se elaboraron en total a base de distintos ejemplares de quella cocinada según 2 recetas distintas (cazuela de quella y quella frita en adobo), 25 piensos diferentes. La figura 38 muestra los datos de concentración de mercurio y selenio en cada uno de los piensos preparados como se describió anteriormente.

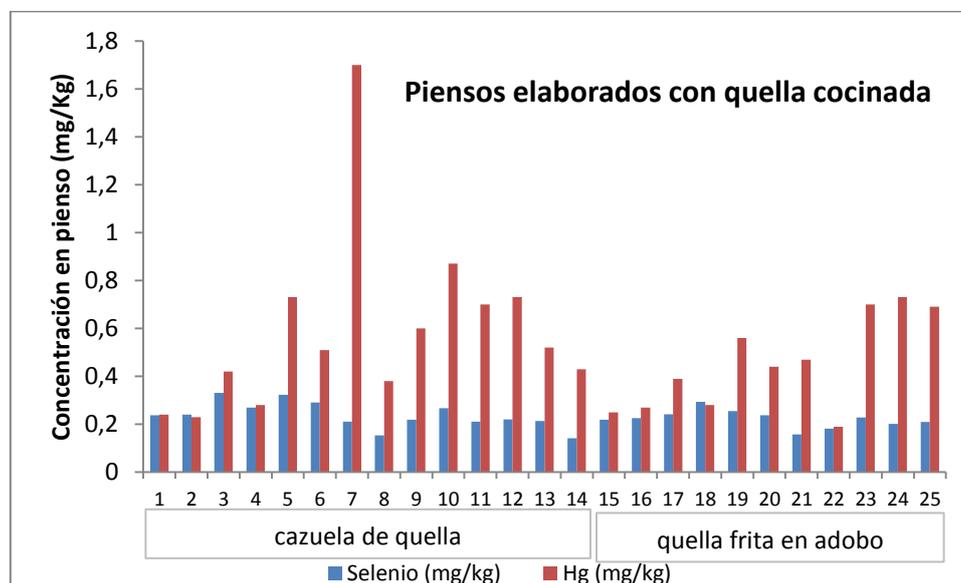


Figura 38: concentración de Hg y Se (mg/kg) en los piensos elaborados con un contenido de 13-20% de quella cocinada según las recetas "cazuela de quella" y "quella frita en adobo".

Como puede observarse, una elevada proporción (23 de un total de 25) de los piensos elaborados con quella cocinada presentan concentraciones (mg/kg) de Hg superiores a la concentración de Se.

Dado que la toxicidad del mercurio se debe en gran medida a su unión con los grupos sulfuro de las proteínas, y a la unión de modo irreversible a las selenoenzimas, bloqueando su función, lo cual podría explicar el daño oxidativo que se atribuye al metilmercurio, es la relación molar entre el Hg y el Se un parámetro fundamental, observándose toxicidad cuando existe un exceso molar de mercurio respecto al selenio en el tejido afectado⁶. Para simplificar la evaluación de riesgos del Hg y los beneficios del Se, se aplica actualmente una ecuación que relaciona las concentraciones molares de ambos elementos de la siguiente forma: $HBV_{Se} = (Se - Hg) / Se * (Se + Hg)$; de este modo, en el pescado en el que se obtiene un valor negativo del índice HBV_{Se} , presenta un riesgo incrementado de efectos adversos en el desarrollo cognitivo de los niños. Por el contrario, valores positivos del índice HBV_{Se} , ofrecen una expectativa de resultados beneficios del consumo. La magnitud de los valores, sean positivos o negativos, indican los beneficios o riesgos relativos⁷.

Para obtener esta relación aproximada riesgo/beneficio en el pienso, se realizó el cálculo del índice HBV_{Se} . Se representa en la figura 39.

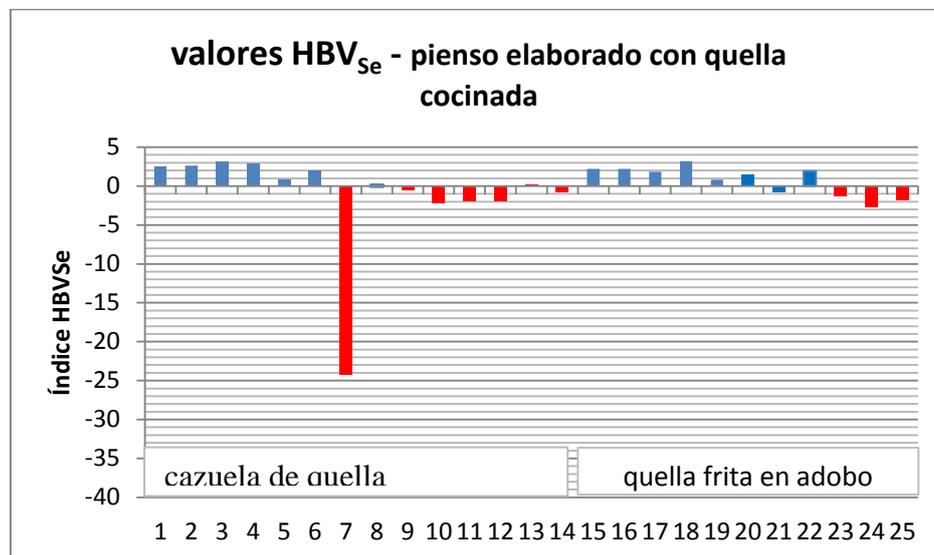


Figura 39: Valores del índice HBV_{Se} obtenidos en los piensos elaborados con quella cocinada según las recetas “cazuela de quella” y “quella frita en adobo”.

En los piensos preparados con quella cocinada, se obtuvo en 10 de los 25 piensos preparados valores negativos para este índice. El valor promedio entre los resultados positivos de este índice es de 1,9, siendo el máximo de 3,2, mientras que los valores negativos llegan a alcanzar valores de -24,2, estando la media de todos ellos en -3,8 y la mediana, en -1,8.

⁶ Berry MJ, Ralston NVC. Mercury toxicity and the mitigating role of selenium. EcoHealth. 2008;5:456–9

⁷ Ralston, N.; Raymond, L.J. Selenium status and intake influences mercury exposure risk assessments. In Selenium in the environment and human health, Bañuelos, L.Y., Ed. Taylor & Francis Group: London, 2014; pp 203-205

4.2.2. Hg y Se en sangre de las ratas alimentadas con los piensos de quella

Los animales se alimentaron durante 3 días en los que se recogen sus heces, que posteriormente se secan. Transcurrido este tiempo se sacrifican los animales y se procede a su desangrado para así obtener los sueros sanguíneos. Los resultados obtenidos en suero sanguíneo de Hg y Se se muestran en la figura 40:

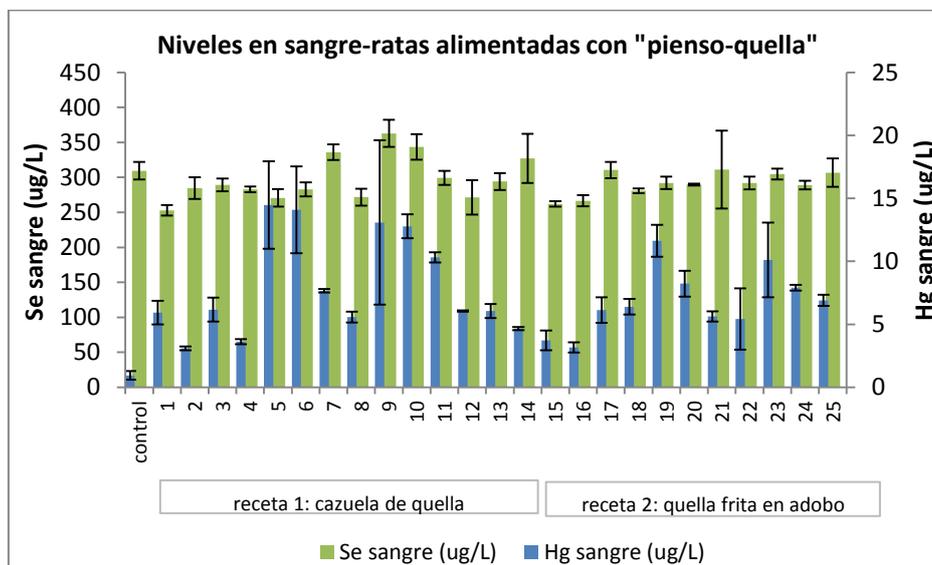


Figura 40: concentración de Hg y Se en las muestras de suero sanguíneo obtenidas de las ratas alimentadas (n = 3) con los piensos con un contenido de 13-20% de quella cocinada según las recetas "cazuela de quella" y "quella frita en adobo". Los resultados representan los valores medios de 3 muestras y las barras de error, el error estándar de la media (SEM).

Como puede observarse, los valores de Se en sangre son relativamente constantes, y similares a los organismos control (alimentados con el pienso control, sin adición de pescado), la mayoría presentaron niveles en el rango 300-350 ug/l, sin embargo, el valor de Hg es variable, como sucedía con el me-Hg, y superior en todos los casos al Hg en sangre en las ratas control. Estos valores, en el rango entre 3 y 10 ug/l de Hg en sangre, y con máximos que no superan, en promedio, los 15 ug/l de Hg, varían en función del Hg que han ingerido previamente en el pienso. Las concentraciones en sangre de determinados elementos tóxicos, como el Hg en este caso, pueden ser biomarcadores de la exposición continuada y del grado de acumulación en el organismo, así como la de elementos esenciales, como el Selenio⁸.

⁸ Cornelis, R., et al., *Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 1996. **10**(2): p. 103-127.

4.2.3. Mercurio eliminado en heces – roedores alimentados con “pienso quella”

Se analizó el contenido de Hg y Se en heces en las muestras correspondientes a los roedores alimentados con pienso conteniendo quella, para completar los datos del estudio *in vivo* realizado con las 3 especies de pescados y se obtienen las siguientes figuras 41 y 42:

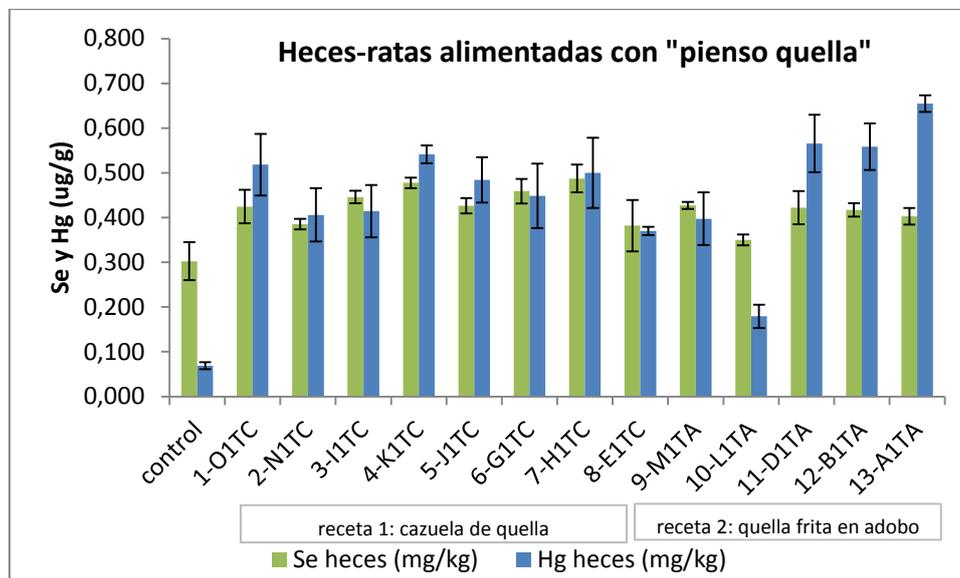


Figura 41: concentración de Hg y Se en las muestras de heces obtenidas de las ratas alimentadas (n = 3) con los piensos con un contenido de 14-20% de quella cocinada según las recetas “cazuela de quella” y “quella frita en adobo”. Los resultados representan los valores medios de 3 muestras y el SEM.

Los valores de Hg total excretado a través de las heces no mostraron una buena correlación con el Hg total que han ingerido previamente, en la continuación del experimento en ratas alimentadas con pienso elaborado con quella cocinado (figura 42), al contrario que sucedía en las que se alimentaron con piensos elaborados con espada y marrajo cocinado (que mostraron una buena correlación, R^2 comprendido entre 0,70 y 0,87; memoria anterior).

Si tenemos en cuenta los datos totales para los experimentos realizados con “pienso quella”, la correlación que obtenemos entre el Hg ingerido y el Hg en heces (figura 42) es inferior a la obtenida con los datos preliminares (menor nº de muestras analizadas, en los que el Hg total ingerido mostraba valores inferiores a 50 µg en todos los casos).

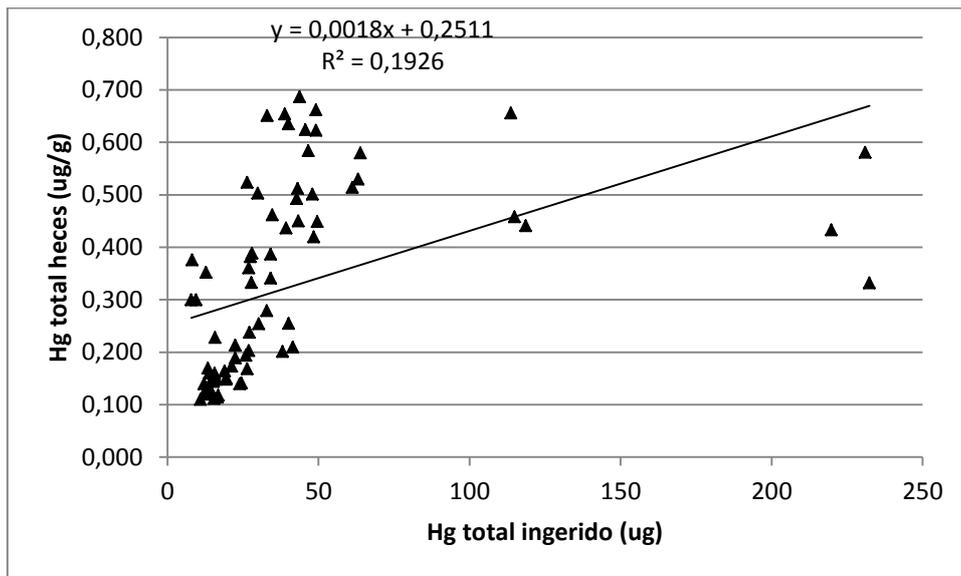


Figura 42: relación entre el Hg total ingerido y el Hg total en las heces de las ratas alimentadas con pienso elaborado con quella cocinada.

4.3. Marrajo

4.3.1. Piensos elaborados con marrajo cocinado

En cuanto a los piensos preparados con marrajo cocinado, se obtuvieron los siguientes datos de concentración (mg/kg) de Hg y Se:

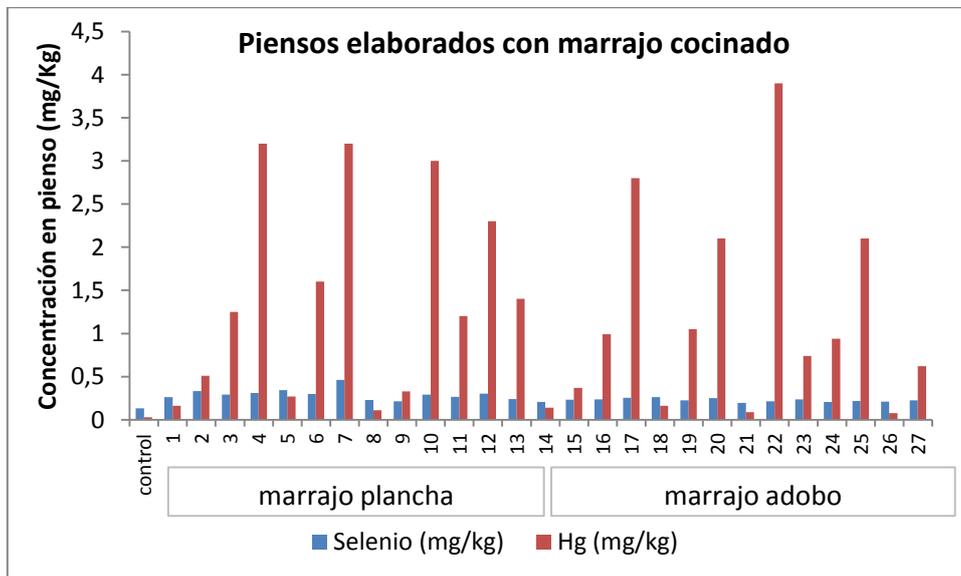


Figura 43: concentración de Hg y Se (mg/kg) en los piensos elaborados con un contenido de 15-20% de marrajo cocinado según las recetas "marrajo a la plancha" y "marrajo en adobo".

Como en el caso de la quella, la mayoría de los piensos presentan un valor de Hg superior al de Se, acorde con el contenido inicial de Hg en los ejemplares de marrajo. Para obtener un valor más adecuado del riesgo, se calculó el índice HBVSe, que se representa a continuación.

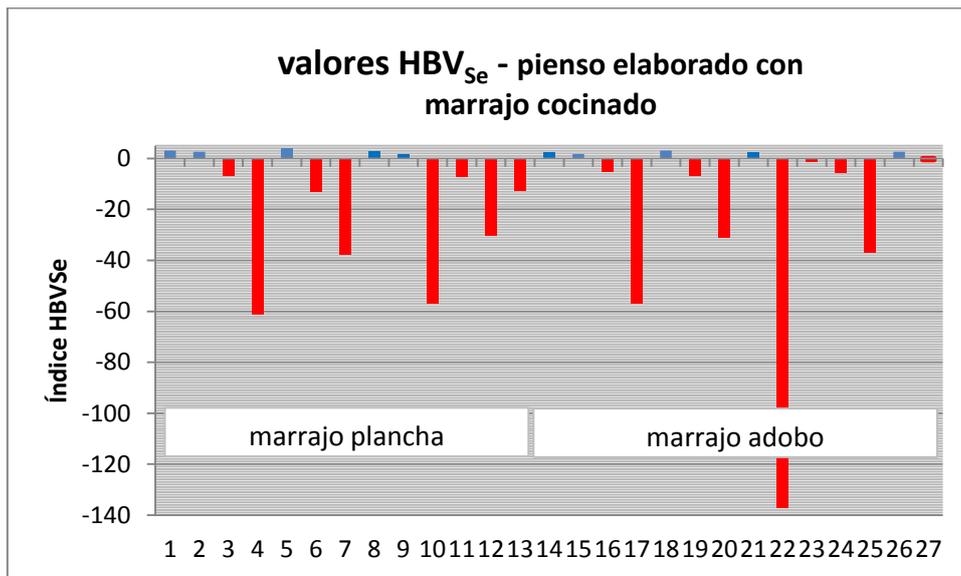


Figura 44: Valores del índice HBVSe obtenidos en los piensos elaborados con marrajo cocinado según las recetas “marrajo plancha” y “marrajo adobo”.

El índice HBVSe presentó valores negativos en 17 de los 27 piensos preparados con porciones de distintos ejemplares, como se aprecia en la figura 44. El valor promedio entre los resultados positivos de este índice es de 2,6, siendo el máximo de 3,9, mientras que los valores negativos llegan a alcanzar valores de -137,4, estando la media de todos ellos en -30.

4.3.2. Hg y Se en sangre de las ratas alimentadas con los piensos de marrajo

Tras alimentar a las ratas durante 3 días, se obtuvieron los sueros sanguíneos. Los resultados obtenidos en suero sanguíneo de Hg y Se se muestran en la figura 45 :

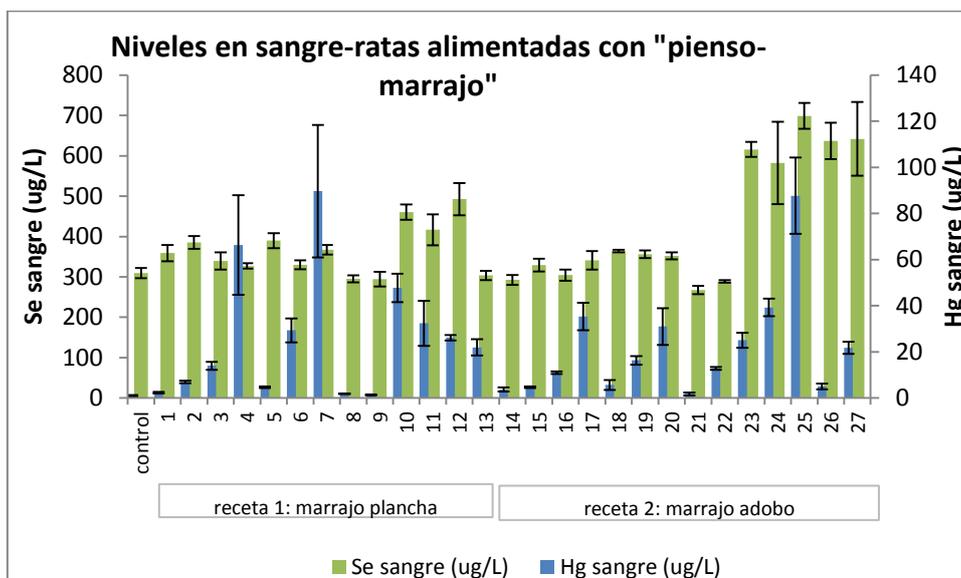


Figura 45: Concentración de Hg y Se en las muestras de suero sanguíneo obtenidas de las ratas alimentadas (n = 3) con los piensos con un contenido de 15-20% de marrajo cocinado según las recetas “marrajo plancha” y “marrajo adobo”. Los resultados representan los valores medios de 3 muestras y las barras de error, el error estándar de la media (SEM).

Como puede observarse, los valores de Se en sangre son relativamente constantes, si bien en este caso algunos organismos (15 de un total de 81 ratas) presentaron niveles medios superiores de Se, en torno a 600-700 $\mu\text{g/l}$, mientras que la mayoría presentaron niveles en el rango 300-400 $\mu\text{g/l}$, al igual que en las ratas alimentadas con “pienso quella”; sin embargo, los valores de Hg son variables, y varían en función del Hg que han ingerido previamente en el pienso. Los mayores niveles de Se en sangre no parecen corresponderse con mayor concentración de Se en el alimento, sino con un índice HBVSe no tan desfavorable como en los demás piensos, si bien no es constante en todas las muestras esta observación.

El valor de Hg es variable, en función del Hg que han ingerido previamente en el pienso, y superior en todos los casos al Hg en sangre en las ratas control. La mayoría de las ratas presentan valores en sangre entre 5 y 40 $\mu\text{g/l}$ de Hg, siendo 3 grupos (n=3) los que presentan valores superiores, entre 80 y 100 $\mu\text{g/l}$ de Hg, en relación con los niveles elevados de Hg en los piensos con los que se alimentaron, si bien tampoco se repite la observación acerca de esta relación en todas las muestras.

4.4. Pez Espada

4.4.1. Piensos elaborados con espada cocinado

En cuanto a los piensos preparados con espada cocinado, se obtuvieron los siguientes datos de concentración (mg/kg) de Hg y Se:

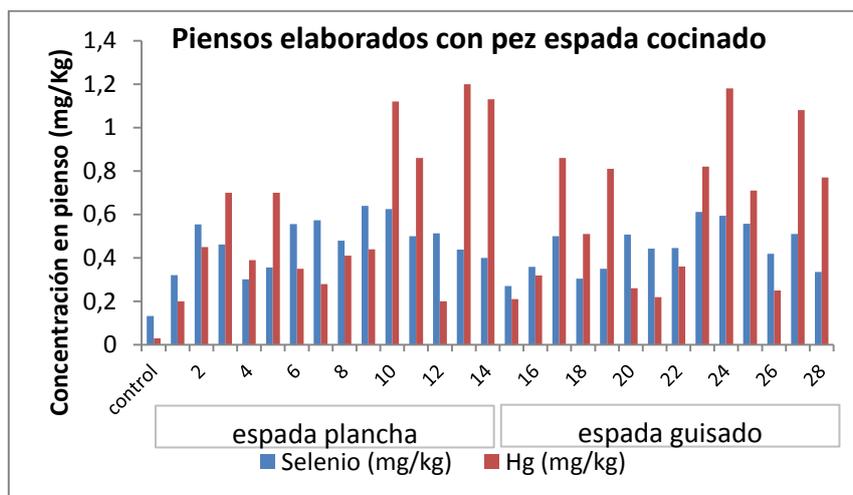


Figura 46: concentración de Hg y Se (mg/kg) en los piensos elaborados con un contenido de 15-20% de espada cocinado según las recetas “espada a la plancha” y “espada guisado”.

En este caso, una menor proporción de piensos elaborados con pez espada cocinado (15 de un total de 28 muestras de piensos) presentó mayor contenido en Hg que en Se; esto se debe fundamentalmente a que el Se aportado por el pez espada al pienso es mayor que el aportado por las otras dos especies del estudio (quella y marrajo), dichos piensos presentan un valor promedio de Se en torno a 0,2 mg/kg, mientras que el pienso elaborado con espada presenta valores en el rango de 0,3 a 0,6 mg/kg. No obstante, todos los piensos presentaron un resultado de Se superior al contenido en Se del pienso control (0,13 mg/kg).

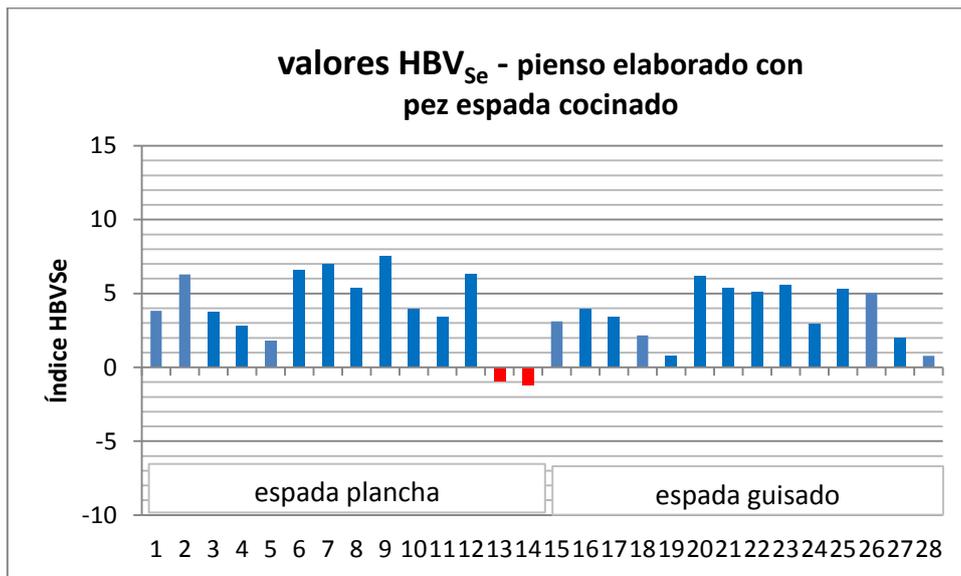


Figura 47: Valores del índice HBVSe obtenidos en los piensos elaborados con espada cocinado según las recetas “espada plancha” y “espada guisado”.

Atendiendo a los valores HBVSe, tan solo 2 de los 28 piensos preparados con muestras de pez espada cocinado presentaron valores negativos del índice HBVSe (figura 47); el valor promedio entre los resultados positivos de este índice es de 4,4, siendo el máximo de 7,5, mientras que los valores negativos no sobrepasaron -1,2.

4.4.2. Hg y Se en sangre de las ratas alimentadas con los piensos de espada

Tras alimentar a las ratas durante 3 días, se obtuvieron los sueros sanguíneos. Los resultados obtenidos en suero sanguíneo de Hg y Se se muestran en la figura 48:

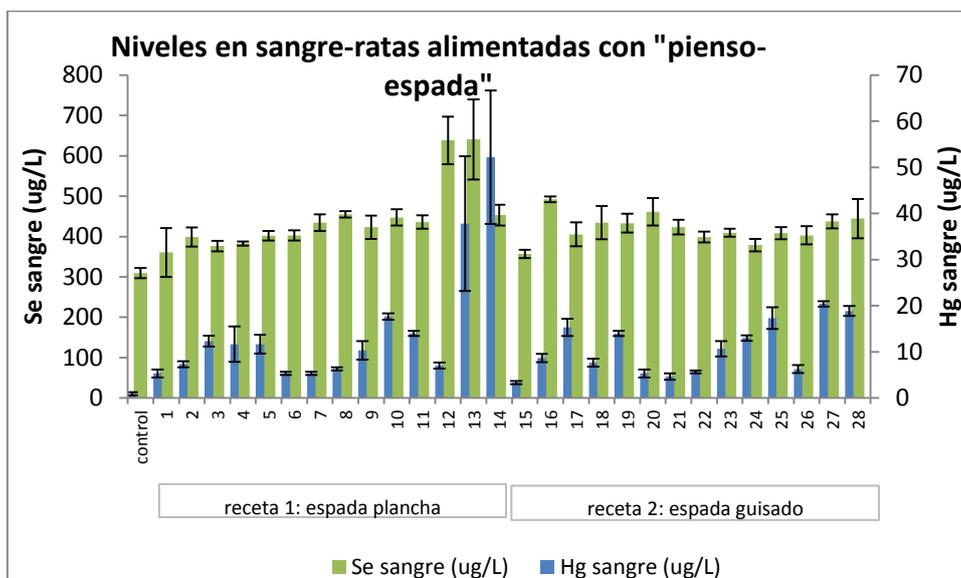


Figura 48: concentración de Hg y Se en las muestras de suero sanguíneo obtenidas de las ratas alimentadas (n = 3) con los piensos con un contenido de 15-20% de espada cocinado según las recetas “espada plancha” y “espada guisado”. Los resultados representan los valores medios de 3 muestras y las barras de error, el error estándar de la media (SEM).

Como puede observarse, los valores de Se en sangre son relativamente constantes, en el rango 300-500 µg/l, similares a los organismos alimentados con piensos de marrajo y quella, y a los organismos control, alimentados con pienso estándar sin adición de pescado. También en los organismos alimentados con pienso espada, algunos roedores (6 de un total de 84 ratas) presentaron niveles medios superiores de Se, en torno a 600-700 µg/l, al igual que en una pequeña proporción de las ratas alimentadas con “pienso marrajo”; sin embargo, los valores de Hg son variables, y varían en función del Hg que han ingerido previamente en el pienso. Los mayores niveles de Se en sangre no se corresponden con una mayor concentración de Se en el alimento, sino curiosamente cada grupo de ellos (n=3) alimentado con pienso que presentó en un caso, un índice HBVSe favorable (pienso 12), y en el otro grupo, un índice HBVSe ligeramente desfavorable.

Como sucede con los dos grupos de roedores alimentados con “pienso quella” y “pienso marrajo”, respectivamente, el valor de Hg es variable, en función del Hg que han ingerido previamente en el pienso, y superior en todos los casos al Hg en sangre en las ratas control, entre 5 y 20 µg/l, siendo especialmente elevado, en el rango 40-50 µg/l de Hg en sangre, en las ratas alimentadas con los 2 únicos piensos elaborados con espada cocinado en los que el índice HBVSe fue desfavorable. Estos valores son inferiores a los hallados en sangre de las ratas alimentadas con pienso “marrajo”, la mayoría con valores entre 5 y 40 µg/l de Hg y los máximos, también superiores, entre 80 y 100 µg/l de Hg. Por el contrario, los valores hallados en la sangre de las ratas alimentadas con “pienso quella” presentaron valores inferiores a los alimentados con “pienso marrajo” y “pienso espada”, en el rango entre 3 y 10 µg/l de Hg en sangre, y con máximos que no superan, en promedio, los 15 µg/l de Hg.

4.5.Datos finales – Hg y Se eliminados en los experimentos *in vivo* con roedores alimentados con piensos adicionados con quella, marrajo y pez espada

Con la totalidad de los datos recopilados en el estudio, podemos establecer la relación que existe entre la cantidad de contaminante ingerida a partir de los piensos preparados con pez espada, con marrajo y con quella cocinados, y la cantidad de contaminante excretada a través de las heces. De esta manera se obtiene el % de mercurio que estaría biodisponible en el organismo en los roedores, en las condiciones de este estudio. Se ha determinado también la relación entre el selenio ingerido y el selenio excretado, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7:

Tabla 7: porcentajes del contaminante Hg y del componente Se, excretados a través de las heces, en relación a la cantidad ingerida a través de los piensos por las ratas del estudio (100 x cantidad total excretada en heces/cantidad total ingerida por pienso), y porcentajes de biodisponibilidad teórica, calculados por diferencia (100 - % componente expulsado).

Pensos		n	% componente expulsado en heces				% componente biodisponible			
			Mín (%)	Máx (%)	Media (%) ± SEM	Mediana (%)	Mín (%)	Máx (%)	Media (%) ± SEM	mediana (%)
Espada	Hg	66	3,4	8,1	5,4±0,1	5,1	91,9	96,6	94,6±0,1	94,8
	Se	66	13,9	27,5	19,5±0,4	19,0	72,5	86,1	80,1±0,4	80,6
Marrajo	Hg	42	2,9	11,5	5,7±0,3	5,3	88,5	97,1	94,3±0,3	94,7
	Se	42	12,6	22,3	17,6±0,4	18,1	77,8	87,4	82,4±0,4	81,9
Quella	Hg	39	1,0	12,2	6,5±0,4	6,9	87,8	99,0	93,5±0,4	93,1
	Se	39	12,7	24,1	18,8±0,5	18,9	75,9	87,3	81,2±0,5	81,1

El Hg total eliminado en las heces se encuentra entre un 1% y un 12%. Los valores medios de eliminación son similares en los animales alimentados con piensos de pez espada y de marrajo cocinado, 5,4% y 5,7% de Hg total, respectivamente, siendo ligeramente superiores en el caso de la quella, de 6,5%. Globalmente, son valores de excreción que nos dan idea del porcentaje de Hg total que permanece en el organismo tras la ingestión, en torno a un 94%. Estudios previos refieren que sobre un 95% del metil-mercurio ingerido se absorbe a través del tracto gastrointestinal^{9,10}.

Teniendo en cuenta la totalidad de los datos, se observan porcentajes mayores de mercurio expulsado en heces cuando el Hg presente en el pienso es inferior o igual a 0,7 mg/kg; no obstante apenas hay una variación notable, siendo bajo el grado de correlación entre el porcentaje de Hg expulsado y el contenido de Hg en el alimento.

⁹ Kershaw, T.G., P.H. Dahir, and T.W. Clarkson, *The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man*. Archives of Environmental Health: An International Journal, 1980. **35**(1): p. 28-36.

¹⁰ Hong, Y.-S., Y.-M. Kim, and K.-E. Lee, *Methylmercury exposure and health effects*. Journal of Preventive Medicine and Public Health, 2012. **45**(6): p. 353-363.

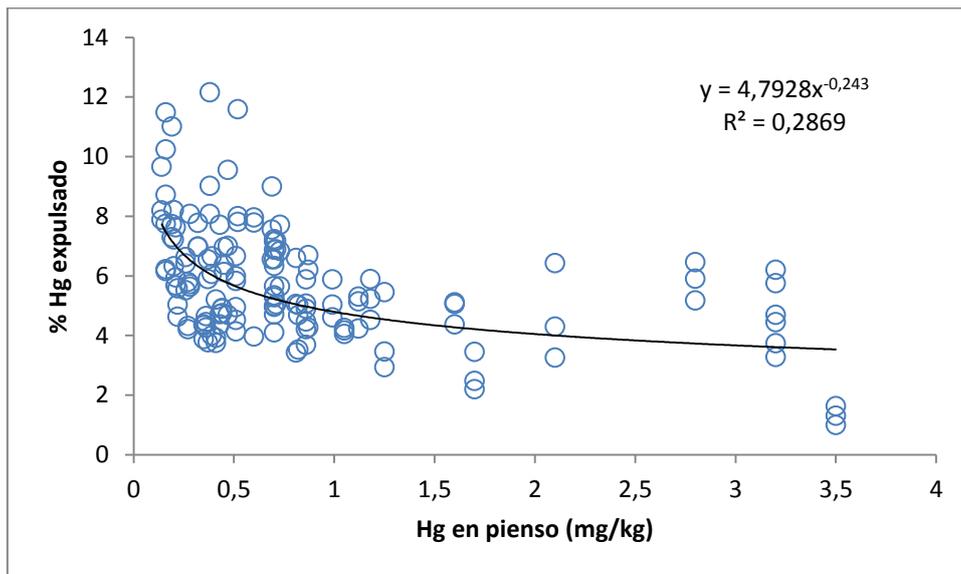


Figura 49: relación entre el porcentaje de Hg expulsado en heces y el contenido de Hg en el pienso elaborado con las 3 especies de pescado del estudio (espada, marrajo y quella) cocinadas. La gráfica muestra los datos globales obtenidos de las ratas alimentadas con los piensos.

En lo que se refiere a metilmercurio, se ha descrito que la mayor parte de lo que se excreta, se ha disuelto por desmetilación y se excreta a través de las heces en forma iónica, siendo muy reducida la excreción a través de la orina¹¹. Por este motivo, en esta última etapa del estudio no se realizó el análisis de metilmercurio en heces.

Se ha sugerido que el selenio está involucrado en la desmetilación del me-Hg y que los gránulos Hg-Se que se han hallado en el hígado de aves y mamíferos marinos serían el producto final de la biotransformación del MeHg. De igual forma, el MeHg se une a las selenoproteínas y las inactiva (referencias citadas por¹²).

Aunque anteriormente observamos una correlación no muy alta ($R^2=0,42$) entre la cantidad total (μg) de Se excretada y la cantidad total de Hg (μg) excretado por las ratas alimentadas con “pienso espada”, más débil todavía en el caso de las alimentadas con “pienso-marrajo” ($R^2=0,313$); sí observamos una mejor correlación en las ratas alimentadas con pienso quella ($R^2=0,633$) (figura 50).

¹¹ Hong, Y.-S., Y.-M. Kim, and K.-E. Lee, *Methylmercury Exposure and Health Effects*. Journal of Preventive Medicine and Public Health, 2012. **45**(6): p. 353-363.

¹² Achouba, A., et al., *Plasma levels of selenium-containing proteins in Inuit adults from Nunavik*. Environment International, 2016. **96**(Supplement C): p. 8-15.

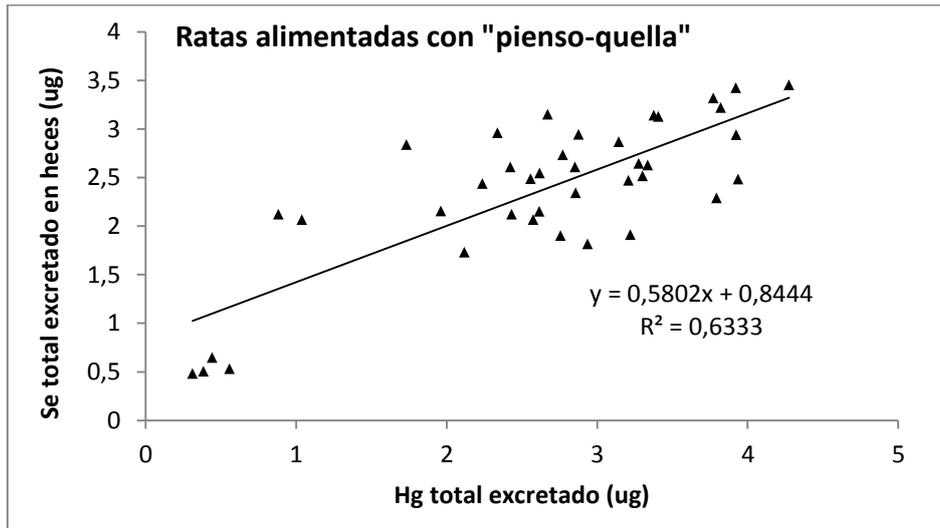


Figura 50: Correlación entre la cantidad de Se excretado y la cantidad de Hg total excretado en ratas alimentadas con pienso-quella

Si representamos todos los valores obtenidos de Hg y Se en heces en los roedores alimentados con los 3 tipos de pienso adicionado con pescado, en escala logarítmica, podemos resumir la información que nos aporta el estudio *in vivo* de la eliminación de ambos elementos en cada grupo.

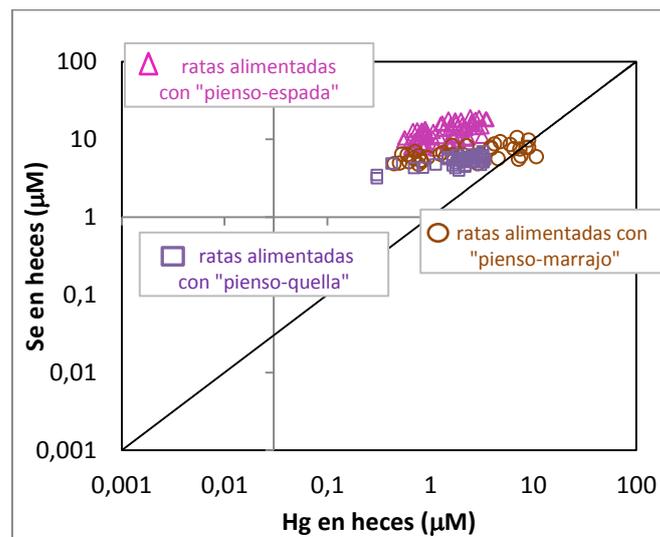


Figura 51: Representación en escala logarítmica de los valores de Se y Hg en heces, expresados en micromolar.

Se puede observar que los niveles de excreción a través de heces de Se son similares en las ratas alimentadas con "pienso-marrajo" (valor medio 6,6 micromolar), y en las alimentadas con "pienso-quella" (valor medio 5,3 micromolar), mientras que en ratas alimentadas con "pienso-espada" los niveles de excreción de Se son superiores, (valor medio 12,8 micromolar). Este dato puede estar en relación con los mayores niveles de Se ingeridos por los organismos alimentados con los piensos elaborados con espada, también reflejado en los niveles de Se en sangre.

En cuanto a los niveles de excreción de Hg, los valores de Hg presentan una distribución diferente en los 3 grupos alimentados con distintos pescados, dependiendo principalmente de la cantidad de Hg ingerida en la dieta, ya que la cantidad de Hg excretada está directamente

relacionada con la cantidad de Hg ingerida, si bien esta relación no es tan clara en el caso de los roedores alimentados con quella (figura 42).

4.6. Datos finales – Hg y Se en sangre en los experimentos *in vivo* con roedores alimentados con piensos adicionados con quella, marrajo y pez espada

En ninguno de los experimentos se observó correlación entre los niveles en sangre de Se y de Hg total, al contrario de lo que se describe en otros estudios¹³, una vez completados los análisis en el conjunto de las muestras, con los roedores alimentados con los distintos piensos de quella, de espada y de marrajo.

La relación molar Se:Hg en sangre, considerada un parámetro importante en la evaluación del riesgo, se representa en la figura 52, en todos los organismos del estudio alimentados con los piensos preparados con marrajo, quella y espada, así como en los organismos control, alimentados con el pienso estándar sin adición de ningún pescado.

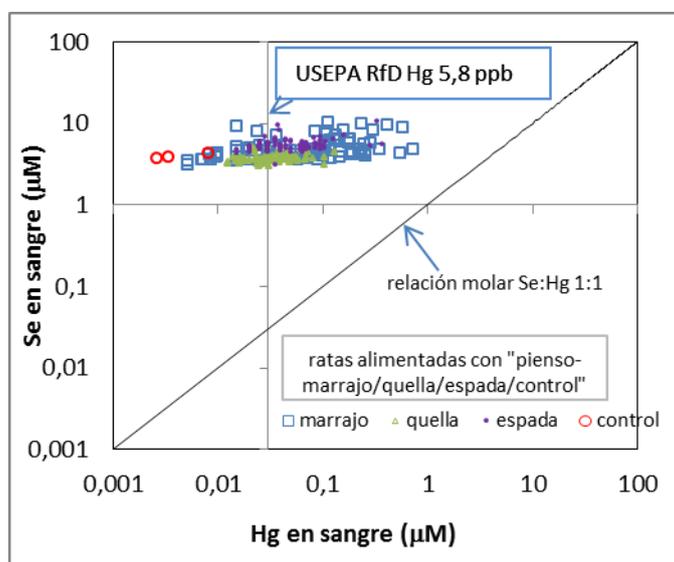


Figura 52: Representación en escala logarítmica de los valores de Se y Hg en sangre (micromolar) en ratas alimentadas con piensos elaborados con los pescados objeto de estudio.

En todos los casos, los valores obtenidos están en la “zona favorable” en la que la relación molar Se:Hg es superior a 1. Una parte importante de los datos de Hg en sangre sobrepasa el valor indicado por USEPA como dosis de referencia, teniendo en cuenta el Hg, sin el efecto del Se. En el caso de los organismos control, alimentados con pienso estándar, que presentó un valor de Hg inferior al límite de cuantificación, la relación Se:Hg en sangre es la más favorable.

Atendiendo a los valores presentes de Se y Hg en sangre en las ratas alimentadas con los piensos en los que el balance HBVSe resultó ser negativo, se obtiene la figura 53.

¹³ Li, P., Y. Li, and X. Feng, Mercury and selenium interactions in human blood in the Wanshan mercury mining area, China. *Science of The Total Environment*, 2016. **573**: p. 376-381.

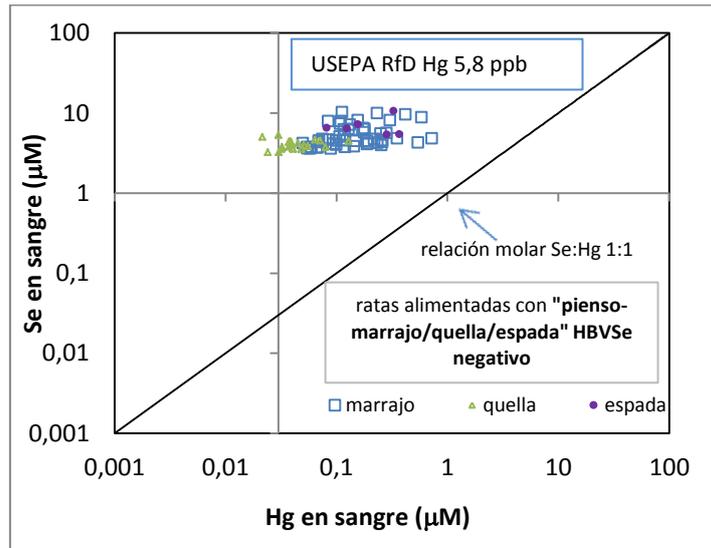


Figura 53: Representación en escala logarítmica de los valores de Se y Hg en sangre, expresados en micromolar en ratas alimentadas con piensos en los que se obtuvo un HBVSe negativo.

En este caso, las concentraciones de Hg en sangre sobrepasan en prácticamente todos los individuos la dosis de referencia indicada por la USEPA, sin embargo, la relación Se:Hg en sangre continúa siendo favorable ya que el Se se mantiene en mayor proporción que el Hg.

A continuación se representa la relación molar Se:Hg frente a la concentración molar de Hg en suero sanguíneo en los roedores alimentados con cada tipo de pienso (figuras 54 a 56). En todos los casos, se observa una correlación negativa entre la relación molar Se:Hg y los niveles de Hg total.

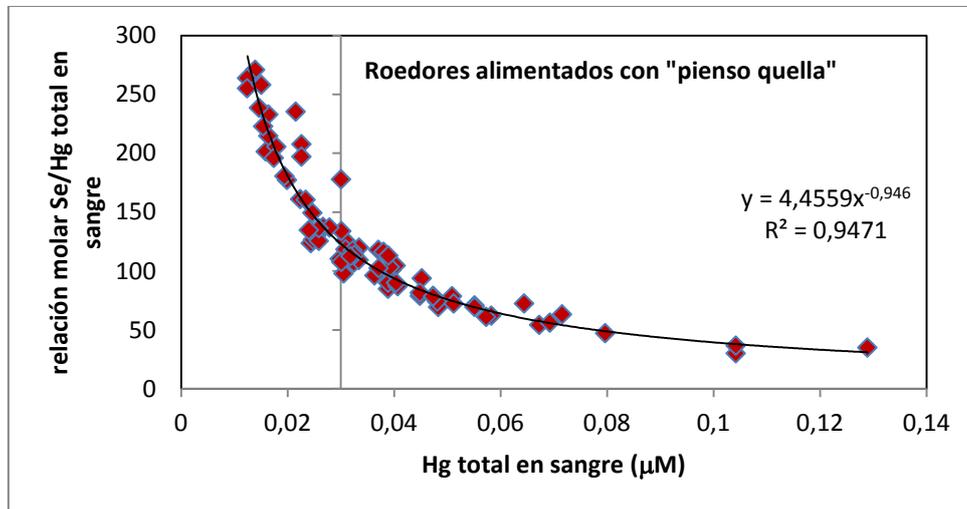


Figura 54: Relación entre Hg total y la relación molar Se:Hg total en suero sanguíneo de las ratas del estudio a las que se administró pienso elaborado con un 12-20% de quella cocinada.

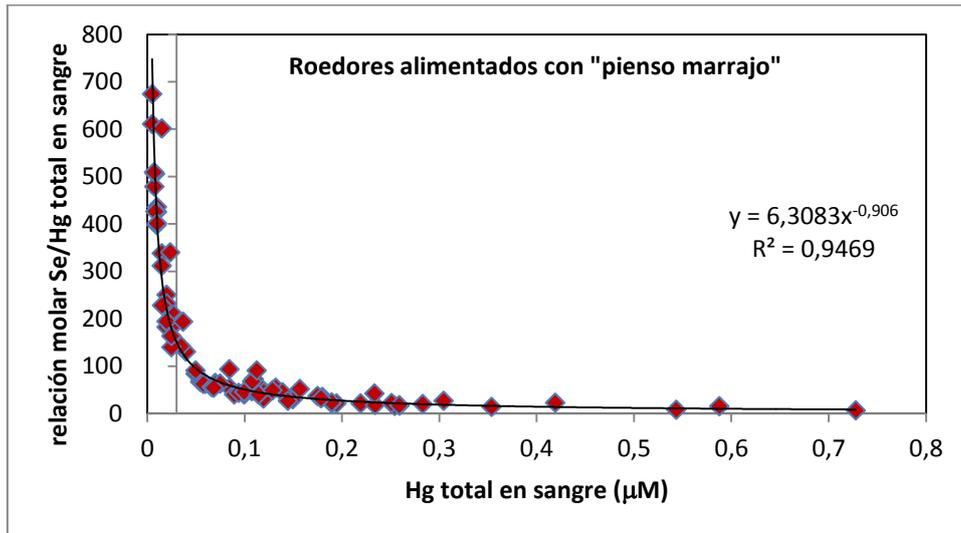


Figura 55: Relación entre Hg total y la relación molar Se:Hg total en suero sanguíneo de las ratas del estudio a las que se administró pienso elaborado con un 15-20% de marrajo cocinado.

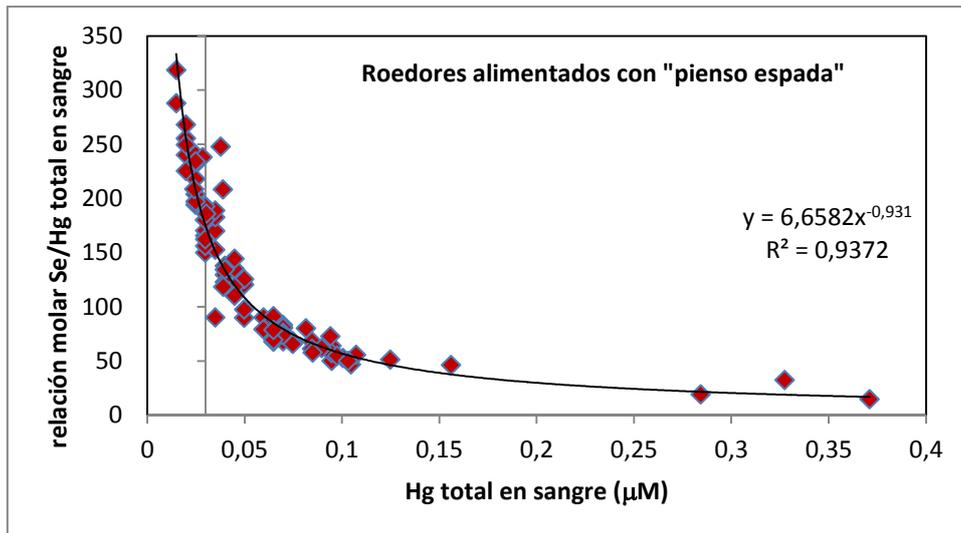


Figura 56: Relación entre Hg total y la relación molar Se:Hg total en suero sanguíneo de las ratas del estudio a las que se administró pienso elaborado con un 15-20% de espada cocinado.

Globalmente, en las condiciones de este estudio, los organismos con mayores niveles de Hg en sangre son los alimentados con piensos adicionados con muestras de marrajo, seguidos por los alimentados con piensos adicionados con muestras de espada, y finalmente, los que menos Hg presentaron en sangre son los alimentados con piensos adicionados con quella. Este hecho está en relación obviamente con la cantidad de Hg presente en el pescado que se adicionó al pienso, pero además con la cantidad real de pienso ingerida por cada roedor, con valores similares en la mayoría de los individuos (promedio $58,4 \pm 0,6$ g pienso ingerido), con la excepción de los alimentados con "pienso quella", de los que 4 individuos, de un total de 75, ingirieron cantidades muy bajas, inferiores a 30 g de pienso.

La relación molar Se:Hg en sangre fue superior a 1 en todos los casos, situándose en el rango 6,6-673,8; esto indicaría una protección de los efectos adversos del Hg en los animales. La relación molar Se:Hg se considera un parámetro importante en la evaluación del riesgo: una

relación molar Se:Hg superior a 1 indicaría una protección a tener en cuenta contra los efectos adversos del mercurio¹⁴.

5. CONCLUSIONES FINALES

1. Al aumentar el tamaño del pescado, se observa mayor concentración de Hg y MeHg. También se aprecia un incremento de estos contaminantes tras el cocinado, sobre todo en ejemplares de mayor talla.
2. En pescado crudo, aproximadamente un 80 % de Hg está en forma de MeHg, mientras que en cocinado es ligeramente superior, de un 85 %.
3. Tanto en muestras de pescado crudas como procesadas, la concentración de Se tiende a ser inferior a la de Hg total.
4. Mediante la ecuación que relaciona las concentraciones molares del Hg y Se (HBVSe), se obtienen algunos resultados negativos en los ejemplares de mayor tamaño, destacando el marrajo, lo cual indica riesgo de efectos adversos. Lo mismo sucede en el pescado cocinado, alcanzando incluso valores negativos de mayor magnitud.
5. Los porcentajes de bioaccesibilidad *in vitro* para el Se son superiores a los del Hg en todas las especies cocinadas.
6. Se obtienen porcentajes de biodisponibilidad mayor al 50 % para el Se en marrajo y tintorera, mientras que la absorción del Hg resultó menor (40-50 %). Por el contrario, las muestras de pez espada presentaron mayor absorción de Hg que de Se.
7. Los valores del HBVSe de los piensos que ingieren las ratas, ofrecen en algunos casos resultados negativos, destacando de forma significativa los obtenidos para el marrajo cocinado.
8. Los niveles de Se en sangre de las ratas son relativamente elevados y constantes (300 µg/L), mientras que los de Hg son muy inferiores y variables (< 80 µg /L).
9. El Hg total excretado en heces corresponde con niveles muy bajos.
10. En la sangre de ratas alimentadas con cualquier pienso, incluyendo aquellos en los que se detectan valores negativos del HBVSe, se obtiene una relación molar Se:Hg superior a 1. Ésta se encuentra en la "zona favorable" indicando protección de los efectos adversos del Hg.

¹⁴ Peterson, S.A., et al., How might selenium moderate the toxic effects of mercury in stream fish of the Western U.S.? *Environmental Science & Technology*, 2009. **43**(10): p. 3919-3925.