

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Departamento de Química Analítica



**ACUMULACIÓN-INTERACCIÓN DE ESPECIES DE  
MERCURIO Y SELENIO EN TEJIDOS ANIMALES:  
DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE  
ANÁLISIS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Ana Isabel Cabañero Ortiz

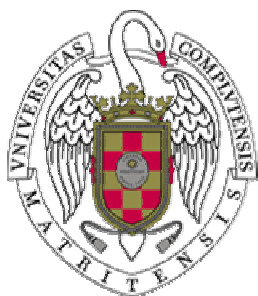
Bajo la dirección de las Doctoras:

Carmen Cámara Rica  
Yolanda Madrid Albarrán

**Madrid, 2005**

**ISBN: 84-669-2837-5**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

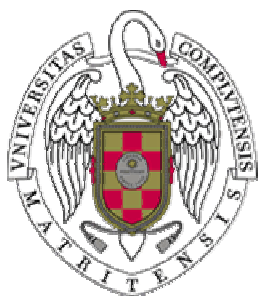


**ACUMULACIÓN-INTERACCIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO Y  
SELENIO EN TEJIDOS ANIMALES: DESARROLLO DE NUEVAS  
METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS**

**ANA ISABEL CABAÑERO ORTIZ**

**Madrid, 2005**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**ACUMULACIÓN-INTERACCIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO Y  
SELENIO EN TEJIDOS ANIMALES: DESARROLLO DE NUEVAS  
METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS**

**Directoras:**

**Dra. Carmen Cámara Rica**

**Dra. Yolanda Madrid Albarrán**

**ANA ISABEL CABAÑERO ORTIZ**

**Madrid, 2005**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria  
28040 Madrid (España)  
Telef. 913944331  
Fax. 913944329

**D<sup>a</sup> CARMEN CÁMARA RICA**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y

**D<sup>a</sup>. YOLANDA MADRID ALBARRÁN**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

**HACEN CONSTAR QUE:**

El presente trabajo, titulado “**ACUMULACIÓN-INTERACCIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO Y SELENIO EN TEJIDOS ANIMALES: DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS**”, ha sido realizado en este Departamento por la Licenciada *D<sup>a</sup>. Ana Isabel Cabañero Ortiz*, constituyendo así la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 12 de mayo de 2005

Fdo. Carmen Cámara Rica

Fdo. Yolanda Madrid Albarrán

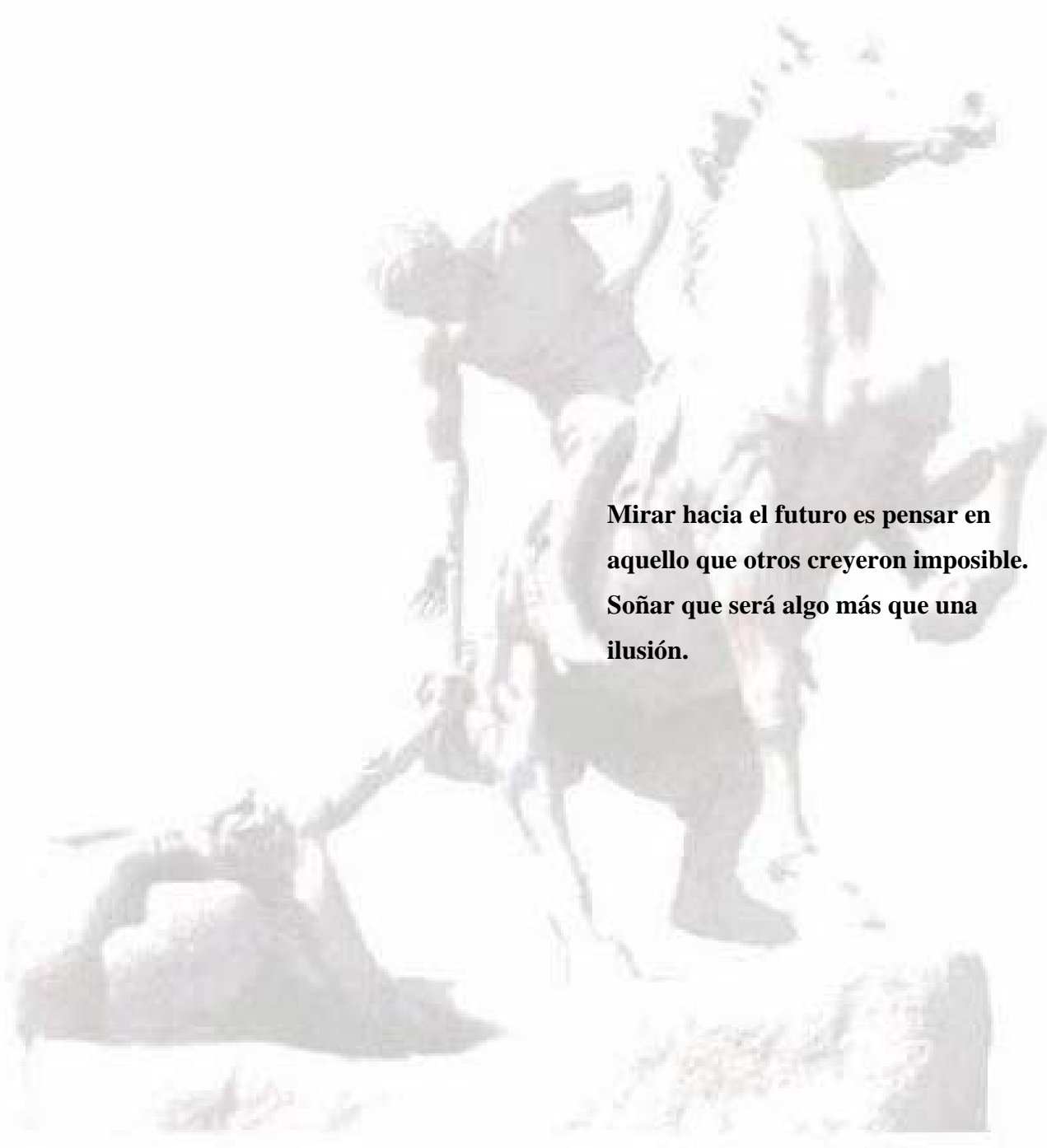
Deseo agradecer a la Dra. Carmen Cámar y a la Dra. Yolanda Madrid, directores de este trabajo, su ayuda constante y su estímulo contínuo en la realización del mismo, así como la formación desinteresada brindada durante estos años.

También quiero expresar mi gratitud a las personas e instituciones que aportaron los medios económicos para llevar a cabo la experimentación, sobre todo al Dto. de Química Analítica de la Universidad Complutense y a su director, D. Jose M. Pingarrón y a la Universidad Complutense por la concesión de una beca.

Muchísimas gracias a todos los compañeros del laboratorio que supieron compartir los buenos, los no tan buenos y los malos momentos, que estuvieron dispuestos a escuchar, a y ayudar en los problemas técnicos. A los que estuvieron (Belén, Marta, Eva, Isabel, Pilar); a los que están (Rocío, Christian, Jon, Mer, Diego, Zoyne, Carmen, Estrella, Ana), y a los que siempre han estado (M<sup>a</sup> Carmen, Rosa y Patricia).

Por último quisiera dar las gracias a todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo ya sea en el aspecto científico como personal.

*A mis apoyos incondicionales, mis padres, mi hermanos y mis abuelos*



**Mirar hacia el futuro es pensar en  
aquello que otros creyeron imposible.  
Soñar que será algo más que una  
ilusión.**

# Índice



# ÍNDICE

## **A. OBJETIVOS..... 1**

## **B. INTRODUCCIÓN**

### **CAPÍTULO I. MERCURIO: ELEMENTO TÓXICO PARA LOS SERES VIVOS**

<b>1. MERCURIO EN EL MEDIO AMBIENTE.....</b>	<b>9</b>
1.1. EMISIONES.....	9
1.2. ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL.....	15
1.3 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO.....	18
<b>2. IMPORTANCIA TOXICOLÓGICA DEL MERCURIO Y SUS DERIVADOS. 22</b>	<b>22</b>
2.1. COMPUESTOS INORGÁNICOS.....	22
2.2. MERCURIO ELEMENTAL.....	23
2.3. COMPUESTOS ORGANOMERCÚRICOS.....	24
<b>3. FUENTES DE EXPOSICIÓN DEL HOMBRE AL MERCURIO..... 26</b>	<b>26</b>
3.1. EXPOSICIÓN OCUPACIONAL Y ACCIDENTES MEDIOAMBIENTALES.....	26
3.2. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA DIETA: BIOACUMULACIÓN.....	29
<b>4. BIBLIOGRAFÍA..... 33</b>	<b>33</b>

### **CAPÍTULO II. SELENIO: ELEMENTO ESENCIAL PARA LOS SERES VIVOS**

<b>1. SELENIO EN EL MEDIO AMBIENTE..... 41</b>	<b>41</b>
1.1. EMISIONES.....	41
1.2. ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL.....	42
1.3 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL SELENIO.....	46
<b>2. RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL SELENIO..... 48</b>	<b>48</b>
2.1. ESENCIALIDAD.....	48
2.2. EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE SELENIO.....	55
2.3. EFECTOS DEL EXCESO DE SELENIO: TOXICIDAD DEL ELEMENTO.....	60
2.4. METABOLISMO DEL SELENIO EN ANIMALES SUPERIORES.....	61
<b>3. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA Y SU BIODISPONIBILIDAD..... 64</b>	<b>64</b>
3.1. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA.....	64
3.2. BIODISPONIBILIDAD DEL SELENIO.....	65
<b>4. BIBLIOGRAFÍA..... 68</b>	<b>68</b>

**CAPÍTULO III. INTERACCIÓN MERCURIO-SELENIO**

<b>1. FORMA QUÍMICA Y EFECTO PROTECTOR / ANTAGÓNICO.....</b>	<b>80</b>
<b>2. EFECTOS DEL SELENIO EN LA DISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO EN ÓRGANOS Y TEJIDOS.....</b>	<b>83</b>
<b>3. POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL SELENIO FRENTE A LA TOXICIDAD DEL MERCURIO.....</b>	<b>86</b>
3.1. REDISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO.....	86
3.2. COMPETENCIA POR LOS MISMOS PUNTOS DE UNIÓN.....	88
3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS Hg-Se.....	89
3.4. CONVERSIÓN DE LAS FORMAS TÓXICAS DE MERCURIO EN OTRAS FORMAS MENOS TÓXICAS.....	93
3.5. PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO.....	94
<b>4. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>96</b>

**CAPÍTULO IV. TRATAMIENTO DE MUESTRA Y TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA  
ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO EN MUESTRAS DE INTERÉS  
BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL**

<b>1. TRATAMIENTO DE MUESTRA.....</b>	<b>103</b>
<b>2. EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO.....</b>	<b>106</b>
2.1. EXTRACCIÓN ÁCIDA.....	106
2.2. EXTRACCIÓN ALCALINA.....	107
2.3. DESTILACIÓN.....	107
2.4. EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	108
2.5. EXTRACCIÓN-PRECONCENTRACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO.....	109
<b>3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO.....</b>	<b>111</b>
3.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	111
3.2. TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS.....	120
<b>4. EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE SELENIO.....</b>	<b>122</b>
4.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES.....	122
4.2. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS.....	124
<b>5. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO.....</b>	<b>130</b>
5.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	131
5.2. TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS.....	138
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>

## C. PARTE EXPERIMENTAL

### CAPITULO V. PROCESOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE Hg, Se Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL

- |   |     |
|---|-----|
| 1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE MERCURIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE PESCADO Y POSTERIOR DETECCIÓN CON FI-CV-AFS Y GC-PYRO-AFS..... | 157 |
| 2. EXTRACCIÓN DE SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE EL USO DE LA SONDA DE ULTRASONIDOS Y POSTERIOR DETECCIÓN CON ICP-MS Y HPLC-ICP-MS.....                  | 167 |

### CAPITULO VI: DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO

- |  |     |
|--|-----|
| 1. CUANTIFICACIÓN Y ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO EN ESPECIES DE PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO EN ESPAÑA Y PORTUGAL .....                            | 181 |
| 2. DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES BIOACCESIBLES EN MUESTRAS DE PESCADO MEDIANTE UN MÉTODO DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> ..... | 193 |

### CAPITULO VII: ACUMULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE MERCURIO EN AVES. EFECTO PROTECTOR DEL SELENIO

- |  |     |
|--|-----|
| 1. EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO DE PIENSOS CON SELENIO Y ARCILLAS EN LA BIOACUMULACIÓN DE MERCURIO.....  | 213 |
| 2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE SELENIO Y SU INTERACCION CON Hg MEDIANTE EL USO DE CV-AFS, ICP-MS Y HPLC-ICP-MS.....                             | 223 |
| 3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN MERCURIO-SELENIO EN HÍGADO DE POLLO MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR ACOPLADA AL ICP-MS..... | 245 |

## D. DISCUSIÓN INTEGRADORA..... 275

## E. CONCLUSIONES..... 299

## F. ANEXO: GLOSARIO DE TÉRMINOS..... 303

*A*

# Objetivos

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

La presencia de mercurio en el medio ambiente se ha incrementado durante los últimos años como consecuencia de la actividad antropogénica, lo que puede suponer un riesgo tanto medioambiental como de salud pública.

Las características físico-químicas del mercurio hacen de él uno de los metales más ubicuos, presentándose en todos los compartimentos medioambientales. Esto, unido a la elevada toxicidad (efectos teratogénicos, inmunotóxicos y especialmente neurotóxicos) de sus especies, hace necesario conocer, por un lado, los niveles de concentración en los que se encuentra, y por otro, los diferentes procesos biológicos que controlan su acumulación y metabolismo.

Por otro lado, es un hecho probado la esencialidad del selenio como micronutriente, destacando por sus funciones biológicas, antioxidantes y catalíticas. Es un elemento indispensable para el adecuado funcionamiento del sistema inmune y su ingesta podría estar asociada con la disminución del riesgo de padecer cáncer. Asimismo, existen evidencias de que el selenio podría contrarrestar la toxicidad del mercurio. Por todo lo expuesto, presenta un gran interés el conocimiento de los procesos vitales en los que este elemento está implicado, así como la identificación de sus especies.

La obtención de información relacionada con los mecanismos de acumulación, distribución, transformación de especies e interacción de ambos elementos se ha convertido en uno de los retos científicos actuales. Sin embargo, esto no es una tarea fácil. Estos analitos se encuentran en muy bajos niveles de concentración en el medio ambiente, dificultad que se incrementa cuando se quieren determinar las especies. Por todo ello, se requiere disponer de una metodología analítica adecuada que combine un tratamiento de muestra que preserve las especies, una separación eficaz de las mismas y un sistema que permita su detección a los bajos niveles de concentración en que se encuentran habitualmente. Esto permitiría añadir una nueva dimensión en la comprensión y entendimiento del papel de estos elementos.

Considerando estos aspectos, los objetivos más relevantes de la presente memoria se han centrado en los siguientes apartados:

### **1. Desarrollo de nuevas metodologías destinadas al aislamiento y a la cuantificación de Hg y Se total y sus especies en muestras de interés biológico y nutricional.**

➤ Evaluación de nuevos procedimientos de tratamiento de muestra que permitan la determinación de las diferentes especies de mercurio presentes en alimentos, preservando la forma química original de las especies.

➤ Desarrollo de una metodología innovadora de tratamiento de muestra (mediante el empleo de una sonda de ultrasonidos) más rápida y sencilla que la disponible para la extracción de selenio en materiales biológicos, y posterior identificación, evitando el riesgo de transformación de las mismas.

➤ Aplicación de las metodologías desarrolladas a la identificación de las formas químicas del Hg y Se presentes en muestras reales (pescados). Uno de los objetivos primordiales de este estudio será estimar la eficiencia del aporte de estos elementos a través de la dieta, después de evaluar su biodisponibilidad.

## **2. Elucidación de los mecanismos de acumulación, distribución, transformación e interacción del mercurio y selenio en aves.**

➤ Evaluación de la biodisponibilidad y acumulación de especies de Hg y Se (administradas a través de la dieta) en aves. Estudio del efecto que ejerce sobre la distribución y acumulación de mercurio en las aves la suplementación en la dieta de materiales absorbentes y antagónicos de la toxicidad del mercurio (Se).

➤ Identificación de las formas químicas de Hg y Se y posibles biotransformaciones de estos elementos en los seres vivos como resultado de su interacción.

# Introducción

- 
1. **MERCURIO EN EL MEDIO AMBIENTE**
    - 1.1. **EMISIONES**
    - 1.2. **ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL**
    - 1.3. **CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO**
  
  2. **IMPORTANCIA TOXICOLÓGICA DEL MERCURIO Y SUS DERIVADOS**
    - 2.1. **COMPUESTOS INORGÁNICOS**
    - 2.2. **MERCURIO ELEMENTAL**
    - 2.3. **COMPUESTOS ORGANOMERCÚRICOS**
  
  3. **FUENTES DE EXPOSICIÓN DEL HOMBRE AL MERCURIO**
    - 3.1. **EXPOSICIÓN OCUPACIONAL Y ACCIDENTES MEDIOAMBIENTALES**
    - 3.2. **EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA DIETA: BIOACUMULACIÓN**
  
  4. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- 

**MERCURIO: ELEMENTO TÓXICO PARA LOS SERES VIVOS**

Capítulo I



## **MERCURIO: ELEMENTO TÓXICO PARA LOS SERES VIVOS**

El mercurio (Hg), se encuentra presente en todos los compartimentos del medio ambiente (atmósfera, geosfera, hidrosfera y biosfera) y a diferencia de lo que sucede con los compuestos orgánicos su degradación no se produce en el medio. Por lo tanto, la cantidad de mercurio total ha permanecido constante desde la formación del planeta aunque, como es natural, la distribución de este elemento no es uniforme ni homogénea.

Durante más de veinte siglos el mercurio ha sido conocido y utilizado por sus especiales características por diversas culturas, sin embargo, su uso se extendió a partir de la revolución industrial. En la actualidad sirve como materia prima en múltiples sectores industriales y también para la producción de diversas manufacturas. Por lo tanto, y tal como muestran diversos estudios<sup>1,2</sup>, la cantidad de mercurio movilizado y que se añade a la biosfera se ha incrementado en los últimos 150 años. Hay que señalar que la demanda industrial de mercurio en los países más desarrollados y por tanto, su producción se ha reducido en casi un 50% en la última década, debido a la mayor preocupación por las consecuencias de los incrementos de la concentración de mercurio que se están encontrando en el medio ambiente.

Su actividad como neurotoxina, su facilidad para acumularse en la cadena alimentaria y los diferentes episodios de envenenamiento, han hecho que el mercurio esté incluido en todas las listas de organismos internacionales como uno de los contaminantes más peligrosos presentes en el medio ambiente.

El conocimiento de los diferentes procesos químicos, físicos, hidrológicos, minerales y biológicos que controlan el transporte y acumulación del mercurio constituye un paso clave para evaluar adecuadamente la toxicidad y peligrosidad de la presencia del mercurio y sus derivados en nuestras vidas<sup>3</sup>. En estos últimos veinte años se ha avanzado mucho en este sentido, pero todavía hay procesos, reacciones y variables por estudiar para tener un conocimiento exhaustivo del comportamiento del mercurio y todos sus derivados en el medio ambiente.

### **1. MERCURIO EN EL MEDIO AMBIENTE**

#### **1.1. EMISIONES**

Los niveles de mercurio en el medio ambiente han aumentado considerablemente desde el inicio de la era industrial. La actividad del hombre ha generalizado los casos de exposición, y las prácticas del pasado han dejado un legado de mercurio que afectan adversamente a los seres humanos y al medio ambiente. Hasta las regiones donde se

registran emisiones mínimas de mercurio, como el Ártico, se han visto adversamente afectadas debido al transporte transcontinental y mundial del mercurio.

La fuente más importante de mercurio es la emisión antropogénica a la atmósfera, aunque también se producen emisiones de mercurio que van directamente al agua y a la superficie terrestre. Una vez liberado, el mercurio permanece en el medio ambiente, donde circula entre el aire, el agua, los sedimentos, el suelo y la biota en diversas formas. Las emisiones actuales junto con el mercurio ya existente en el mundo hacen que este se siga movilizándose, depositándose en la tierra y el agua y volviendo a moverse.

La forma en que se libera el mercurio varía según los tipos de fuentes y otros factores. La mayoría de las emisiones a la atmósfera son en forma de mercurio elemental, que es transportado a regiones alejadas de las fuentes de emisión. Las emisiones restantes se producen en forma de mercurio gaseoso, inorgánico, iónico (como el cloruro de mercurio) o consolidado en partículas. Estas formas tienen un período de vida más corto en la atmósfera y se pueden depositar en tierras o masas de agua a distancias aproximadas de 100 a 1000 kilómetros de su fuente<sup>4</sup>. El mercurio elemental en la atmósfera puede oxidarse, lo que origina una vía importante de depósito en la superficie terrestre y en las aguas.

Una vez depositado, el mercurio puede cambiar de forma (principalmente por metabolismo microbiano) y convertirse en metilmercurio, que tiene la capacidad de acumularse en organismos (bioacumulación) y concentrarse en las cadenas alimentarias (biomagnificación), especialmente en la cadena alimentaria acuática (peces y mamíferos marinos). El metilmercurio es, pues, la forma que causa mayor preocupación.

Las numerosas fuentes de emisión de mercurio a la biosfera que contribuyen a los flujos globales del mercurio se clasifican en tres categorías:

- ➔ *Emisiones antropogénicas*: la movilización o emisión de mercurio derivada de actividades humanas, con transferencia de masa de mercurio a la atmósfera.
  
- ➔ *Emisiones naturales*: la movilización o emisión del mercurio generado de forma natural en la corteza terrestre, por actividad volcánica o por erosión de las rocas, con una transferencia de masa de mercurio a la atmósfera.
  
- ➔ *Re-emisiones de mercurio*: la transferencia de masa de mercurio a la atmósfera por procesos biológicos y geológicos movilizándolo el mercurio que anteriormente se había depositado en la superficie terrestre por actividades humanas o naturales.

### ***Emisiones antropogénicas***

La mayor parte del mercurio presente actualmente en la atmósfera es producto de muchos años de emisiones provenientes de actividades antropogénicas. Es difícil estimar el componente natural de la carga total atmosférica, pero en todo el planeta hay indicios de que las emisiones antropogénicas de mercurio han generado índices de deposición actuales entre 1.5 y 3 veces mayores a los existentes en la época preindustrial<sup>5</sup>. Además, dentro de las áreas industriales y en sus inmediaciones los índices de deposición han aumentado de 2 a 10 veces durante los últimos 200 años.

La aplicación del mercurio en la extracción de plata en las minas del “Nuevo Mundo” (México, Bolivia y Perú) por parte de los conquistadores españoles entre 1570-1820 posiblemente constituyó la mayor emisión antropogénica continuada de mercurio al medio ambiente. Se ha estimado un consumo medio de 468 Tm año<sup>-1</sup> de mercurio en las minas de plata, originando una emisión de 351 Tm año<sup>-1</sup>, lo que supone aproximadamente un 20% del total del Hg emitido por fuentes naturales<sup>6</sup>.

Estudios recientes sitúan las emisiones antropogénicas en 2.000-4.500 Tm año<sup>-1</sup>, de las cuales cerca del 95% se depositan en la superficie terrestre, un 3% en las aguas y un 2% en el aire. Las fuentes antropogénicas más importantes que liberan Hg al medio ambiente son: la industria del cloro-álcali, la combustión de combustibles fósiles (principalmente carbón), la producción de cemento, la minería, actividades metalúrgicas y la incineración de desechos médicos y municipales. Stein y col.<sup>7</sup> estimaron que aproximadamente el 80% de las emisiones antropogénicas de mercurio son emisiones de mercurio elemental a la atmósfera, principalmente de la combustión de combustibles fósiles, actividad minera e incineración de desechos. Un 15% se introduce directamente en el suelo a través de la aplicación de fertilizantes y fungicidas y el vertido de desechos municipales (ej. baterías y termómetros). El 5% restante ocurre mediante el vertido de residuos industriales al agua.

Estudios realizados sobre las emisiones antropogénicas a la atmósfera en los países económicamente desarrollados<sup>8</sup> (Tabla 1) indican que la mayor fuente de mercurio es la combustión. Sin embargo, en aquellos países donde hay explotaciones mineras de oro, ésta es la principal fuente de emisión de mercurio.

Las autoridades sobre el medio ambiente de algunos países consideran al mercurio como contaminante prioritario por sus conocidos efectos perjudiciales y son conscientes de los problemas que causa su uso y liberación al medio ambiente. Por ello, se han adoptado medidas internacionales encaminadas a abordar el problema mundial que supone el mercurio. Gracias a estos esfuerzos se han reducido las emisiones antropogénicas de algunas fuentes importantes en América y Europa. Además, en algunos países desarrollados se han disminuido las emisiones antropogénicas totales en la

atmósfera durante la última década. Por ejemplo, en Canadá las emisiones se redujeron de 33 a 6 toneladas métricas entre 1990 y 2000.

**Tabla 1.** Emisión antropogénica de mercurio a la atmósfera en los Estados Unidos (1997)

Fuente de emisión	Toneladas	% del total de emisiones	Especies de mercurio (%)		
			Hg <sup>0</sup>	Hg <sup>2+</sup>	Hg <sub>p</sub>
Incineración residuos médicos	58.6	26	20	60	20
Desechos municipales	49.8	22	20	60	20
Calderas de carbón, gas y aceite	48.5	22	50	30	20
Calderas de plantas térmicas y otras industrias	28.5	13	50	30	20
Fundición metales (excluido hierro)	8.7	4	85	10	5
Industria cloro-álcali	6.5	3	70	30	0
Otras fuentes puntuales	16.2	7	80	10	10
Fuentes difusas (preparación amalgamas dentales, rotura lámparas fluorescentes, uso en laboratorios)	6.9	3	100	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>223.7</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>18</b>

\* Hg<sup>0</sup> = vapor mercurio elemental, Hg<sub>p</sub>=mercurio asociado a partículas

A pesar del endurecimiento de la legislación durante los últimos años y de la reducción de consumo mundial de mercurio (la demanda global es menos de la mitad de lo que era en 1980) se ha reducido la contaminación atmosférica ocasionada por la producción industrial, pero la contaminación de las aguas debido a la actividad minera sigue siendo significativa<sup>9</sup>.

### **Emisiones naturales**

La importancia del conocimiento de las fuentes y flujos globales de las emisiones naturales de mercurio radica en que este tipo de emisiones no son controlables y por lo tanto no pueden ser reducidas. Desgraciadamente, es muy difícil distinguir entre las emisiones naturales y las emisiones antropogénicas indirectas (re-emisiones), ya que el mercurio acumulado de manera natural participa de las mismas reacciones y procesos de transformación que el de origen antropogénico.

El mercurio es movilizado o liberado a la atmósfera a través de una serie de procesos naturales, incluyendo la desgasificación y erosión de la corteza terrestre, erupciones volcánicas, la evaporación desde la hidrosfera y los incendios forestales<sup>10,11,12,13</sup>. Las emisiones naturales de mercurio están fuera de nuestro control y deben considerarse como parte de nuestro entorno vital a escala local y mundial. En algunas partes del mundo las concentraciones de mercurio en la corteza terrestre se elevan de manera natural, y contribuyen a elevar las concentraciones locales y regionales de mercurio en esas áreas.

Se cree que el Hg es liberado de fuentes naturales principalmente en la forma de Hg<sup>0</sup> vapor, pero el mercurio unido a partículas en suspensión/aerosoles pueden originarse en algunos procesos naturales (ej. erupciones volcánicas).

Lindqvist y col.<sup>14</sup> estimaron las emisiones de Hg natural entre 2.500 y 30.000 toneladas. El flujo global de las erosiones<sup>15</sup> y desgasificaciones, y la contribución de las erupciones volcánicas<sup>16,17</sup> al flujo de mercurio hacia la atmósfera se ha establecido en unas 700 y 830 toneladas de mercurio al año, respectivamente. La cantidad de mercurio que se emite a la atmósfera desde las capas más profundas de la tierra y que se infiltra a través de grietas del manto terrestre se ha estimado en un valor de entre 3.000 y 6.000 toneladas al año de mercurio.

Por último, dentro de este apartado, hay que evaluar la contribución al flujo global del mercurio que tienen los intercambios que se realizan entre los compartimentos medioambientales (agua, suelos, vegetación). El principal mecanismo que gobierna todas estas emisiones es la diferencia en concentraciones de un medio a otro. Este gradiente se produce principalmente entre el aire y los sistemas acuáticos, donde hay una saturación de especies volátiles de mercurio, aunque también se ha observado para los suelos y el aire<sup>18</sup>. Una serie de parámetros (el aumento en la temperatura del suelo, bajas presiones barométricas y tierras húmedas) influyen en estos gradientes de concentración y hacen incrementar el flujo de mercurio hacia la atmósfera<sup>19</sup>. Las condiciones atmosféricas también influyen en el transporte del mercurio entre el agua y el aire. Así, altos vientos y oleaje incrementan el flujo de mercurio hacia la atmósfera.

El papel que juega la vegetación parece ser ambiguo y necesita de mayor investigación. Varios estudios indican que la vegetación participa en el intercambio de mercurio entre los suelos y la atmósfera pero lo hacen de una manera bidireccional, dando lugar a un flujo global casi nulo<sup>20,21</sup>. Sin embargo, los incendios que se producen con frecuencia en la biosfera juegan un papel fundamental dentro del flujo producido por la vegetación. Estudios realizados en el área amazónica sitúan los niveles de emisión entre 2 y 9 toneladas al año por la quema de la selva amazónica brasileña<sup>22</sup>.

### ***Re-emisiones naturales***

Esta denominación hace referencia a la movilización y emisión a la atmósfera de mercurio de origen antropogénico depositado previamente en aguas y suelos. La emisión a la atmósfera desde vertidos de mercurio en suelos contaminados, o las emisiones desde aguas contaminadas son ejemplos de estas emisiones antropogénicas indirectas<sup>23</sup>.

Este proceso amplía enormemente el tiempo medio de permanencia del mercurio en el medio ambiente. Investigaciones recientes de Lindberg y col.<sup>24</sup> muestran índices de re-emisión de aproximadamente 20% durante un periodo de dos años, según mediciones de isótopos estables de mercurio en el noroeste de Ontario (Canadá).

Por su enorme superficie, el sistema marino es de especial importancia en la distribución, transporte y acumulación del mercurio y juega un doble papel de fuente y de depósito. Desafortunadamente, dada la cantidad de variables que tienen influencia en el flujo global que se produce en las superficies de los océanos, existen muy pocos estudios de medidas directas y reales de estos flujos. Las estimaciones realizadas<sup>2,25</sup> indican un flujo global de emisión de unas 2.000 toneladas al año de mercurio hacia la atmósfera.

Las superficies de algunos lagos han sido también evaluadas para determinar la contribución de las aguas terrestres al flujo de mercurio hacia la atmósfera<sup>26</sup>. Estos concluyen que los intervalos de emisión se encuentran entre 3 y 20 ng m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Estos intervalos están influidos en gran medida por la concentración de mercurio en los lagos y en menor medida por la temperatura y la radiación solar.

Pocos estudios similares se han llevado a cabo para establecer la contribución de los ríos a esta re-emisión del mercurio limitándose la mayoría al estudio de estuarios. De una manera global, se ha estimado que solamente el 10% del mercurio presente en los ríos tiene origen antropogénico<sup>27</sup>, aunque a nivel local estas proporciones pueden cambiar enormemente.

Comparados con los sistemas acuáticos, los flujos producidos en los suelos han sido mucho más estudiados. Los suelos próximos a grandes focos de emisión de mercurio (como plantas industriales de cloro, generación de electricidad, etc.) actúan como depósitos que acumulan el mercurio emitido. Se ha establecido que cerca del 30% de la emisión anual de mercurio por parte de estos grandes focos antropogénicos se deposita dentro de un radio de 5 km<sup>28</sup>. Pero hay que tener en cuenta que cuando estos suelos dejan de recibir el flujo de la contaminación antropogénica, se convierten en potentes focos de emisión de mercurio<sup>29</sup> llegando a valores tan altos de índices de emisión como 150.000 ng m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Similares estudios de suelos con alto contenido natural de mercurio (Almadén, España) establecen un flujo de entre 600 y 700 ng m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>.

Las tierras cercanas a aguas contaminadas en las que se depositan sedimentos durante inundaciones o subidas periódicas del nivel del agua constituyen otro tipo de suelo

contaminado con mercurio, muy común en estuarios de ríos contaminados. La contribución global de los suelos de la capa terrestre hacia la atmósfera se ha estimado en unas 2.000 toneladas al año.

## 1.2. ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL

### ATMÓSFERA

En la atmósfera, el mercurio se encuentra mayoritariamente (>95%) como vapor metálico ( $\text{Hg}^0$ )<sup>30,31,32,33</sup>. El resto, aparece en la forma  $\text{Hg}^{2+}$  tanto unido a partículas en suspensión como, en menor medida, en forma gaseosa. Debido a la lenta oxidación del mercurio elemental su tiempo de residencia en la atmósfera es de aproximadamente un año, tiempo suficiente para que se distribuya sobre todo el planeta antes de su deposición en la superficie terrestre. Como consecuencia, y aunque las principales emisiones de mercurio proceden de fuentes puntuales localizadas en zonas industriales, la contaminación por mercurio es global y afecta a zonas remotas del planeta<sup>34</sup>. La forma oxidada del mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) se deposita en un tiempo más corto que va desde horas a cerca de meses a través de deposiciones húmedas (precipitaciones) o secas. Se ha encontrado que el escaso  $\text{Hg}^{2+}$  que se encuentra en forma gaseosa es depositado por vía húmeda de manera mucho más rápida que el  $\text{Hg}^{2+}$  unido a partículas<sup>35</sup>. Además, se estima que el  $\text{Hg}^{2+}$  unido a partículas más pequeñas tiene tiempos de residencia en la atmósfera muy parecidos al mercurio vapor<sup>36</sup>.

Estudios recientes del mercurio atmosférico indican que las actividades antropogénicas han multiplicado los niveles generales del mercurio en la atmósfera por un factor de 3 desde el comienzo de la era industrial.

### SUELOS Y SEDIMENTOS

En los últimos 125 años se han emitido a la atmósfera casi 200.000 toneladas de mercurio, de los cuales cerca del 95% ha sido depositado en la superficie terrestre, convirtiendo los suelos en el principal depósito de este elemento. Esta reserva se convierte en una continua fuente de mercurio, que continuará emitiendo mercurio hacia la atmósfera durante muchos años<sup>37</sup>. Como se ha indicado, los procesos de re-emisión del mercurio a la atmósfera son importantes y vienen controlados principalmente por la transformación de

$\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  que tiene lugar en la superficie del suelo por acción de la luz y diversas sustancias húmicas<sup>38</sup>.

Una vez depositadas, las especies de mercurio están sujetas a un amplio espectro de reacciones químicas y biológicas. Las condiciones de pH, temperatura y contenidos de sales y componentes orgánicos del suelo favorecen la formación de complejos del ion inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) como  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{OH})_2$  o complejos orgánicos<sup>39</sup>. Aunque los complejos inorgánicos son bastante solubles en agua y, por tanto, de gran movilidad, muchos de ellos forman nuevos complejos con la materia orgánica (principalmente con los ácidos fúlvicos y húmicos) y coloides minerales del suelo o sedimento. Son este tipo de complejos los que principalmente definen el comportamiento del mercurio.

Otra de las especies que condicionan la química del mercurio en el suelo y sedimentos es el muy insoluble sulfuro de mercurio ( $\text{HgS}$   $K_s=10^{-53} \text{ mol}^2 \text{ l}^{-2}$ ). Este compuesto de limitada movilidad, es la principal especie presente en los sedimentos contaminados por mercurio<sup>40</sup>, debido a la reducción del  $\text{Hg}^{2+}$  por parte de bacterias sulfato reductoras bajo condiciones anaeróbicas<sup>41,42</sup>.

Por otro lado, el  $\text{Hg}^{2+}$  presente en los suelos y sedimentos en determinadas condiciones se transforma a metilmercurio por diversos mecanismos, siendo los procesos microbianos el principal de ellos. Aproximadamente, y según las características de los diferentes suelos y sedimentos, entre el 1 y 3% del mercurio se encuentra como metilmercurio. Las especies inorgánicas restantes se hallan mayoritariamente unidas a compuestos orgánicos.

## AGUAS

El mercurio que llega a un medio natural acuoso lo hace fundamentalmente como  $\text{Hg}^{2+}$ ; solo una pequeña fracción ( $0.15 \text{ ng l}^{-1}$ ) se introduce directamente como metilmercurio a través de las precipitaciones<sup>43</sup>. Estos compuestos pueden ser asimilados por las especies biológicas presentes en el medio, precipitar bajo formas químicas diversas en los sedimentos o reducirse a mercurio vapor y vaporizarse para volver nuevamente a la atmósfera. Estas transformaciones dependen de diversos factores medioambientales como la actividad microbiana, la temperatura, disponibilidad de carbono orgánico, la presencia de partículas en suspensión, el oxígeno disuelto y el pH.

Como en los suelos, la química del mercurio viene determinada por las diferentes variables biológicas, físicas y químicas de las aguas. Por ello, hay que tener en cuenta las condiciones existentes en las aguas superficiales que hacen diferentes las especies de mercurio presentes en aguas continentales (ríos, lagos, arroyos), en aguas oceánicas y



también en los estuarios y costas de los océanos que son fases intermedias entre las otras dos.

En las aguas dulces superficiales de áreas no contaminadas, el mercurio se encuentra en concentraciones de 1-20 ng l<sup>-1</sup> y se distribuye en varias formas químicas: mercurio elemental que es volátil pero poco reactivo, especies mercúricas y mercurio orgánico, principalmente metilmercurio (MeHg<sup>+</sup>), dimetilmercurio (Me<sub>2</sub>Hg), y etilmercurio (EtHg<sup>+</sup>) en pequeñas cantidades. La distribución de este metal entre la fase acuosa, las fases coloidales y las partículas en suspensión varía espacial y temporalmente. En general, la concentración de Hg<sup>0</sup> es mayor cerca de la interfase aire-agua mientras que los niveles de Hg<sup>2+</sup> y MeHg<sup>+</sup> son más altos cerca de los sedimentos.

En las aguas dulces continentales no contaminadas, el Hg<sup>2+</sup> no se encuentra como ion libre sino formando complejos con OH<sup>-</sup> (Hg(OH)<sup>+</sup>, Hg(OH)<sub>2</sub>, Hg(OH)<sub>3</sub><sup>-</sup>), mientras que en estuarios y océanos los clorocomplejos (HgCl<sup>+</sup>, HgClOH, HgCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>3</sub><sup>-</sup>, HgCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>) son las especies predominantes. En ambientes anóxicos que contengan sulfuro, el mercurio se combina para formar el precipitado de sulfuro (HgS)<sup>44</sup>. También en disolución en presencia de sulfuro, se encuentran los complejos de sulfuro (HgS<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, HgS<sub>2</sub>H<sup>-</sup> y HgS<sub>2</sub><sup>2-</sup>) como mayoritarios<sup>45</sup>. Además, una fracción de Hg<sup>2+</sup> es probable que se encuentre unida a los ácidos húmicos. Las reacciones del ion mercúrico son relativamente rápidas y se cree que en ellas existen varias especies en equilibrio incluidas aquellas unidas a material particulado.

El metilmercurio se comporta en términos químicos igual que el mercurio inorgánico, encontrándose principalmente unido a partículas y a la materia orgánica disuelta<sup>46</sup>. El complejo con cloruro (CH<sub>3</sub>HgCl) en el medio marino y el hidroxocomplejo neutro (CH<sub>3</sub>HgOH) en aguas continentales son mayoritarios. En presencia de sulfuro se forma el CH<sub>3</sub>HgS<sup>-</sup>, pero éste tiene menos importancia que los complejos sulfúricos del mercurio inorgánico.

En el océano las especies organomercuriales se generan por debajo del termoclinae, a profundidades comprendidas entre los 300-500 m en las que los niveles de oxígeno son inferiores a 100 μM. En cambio, la transformación y eliminación de estas especies tiene lugar en las aguas superficiales.

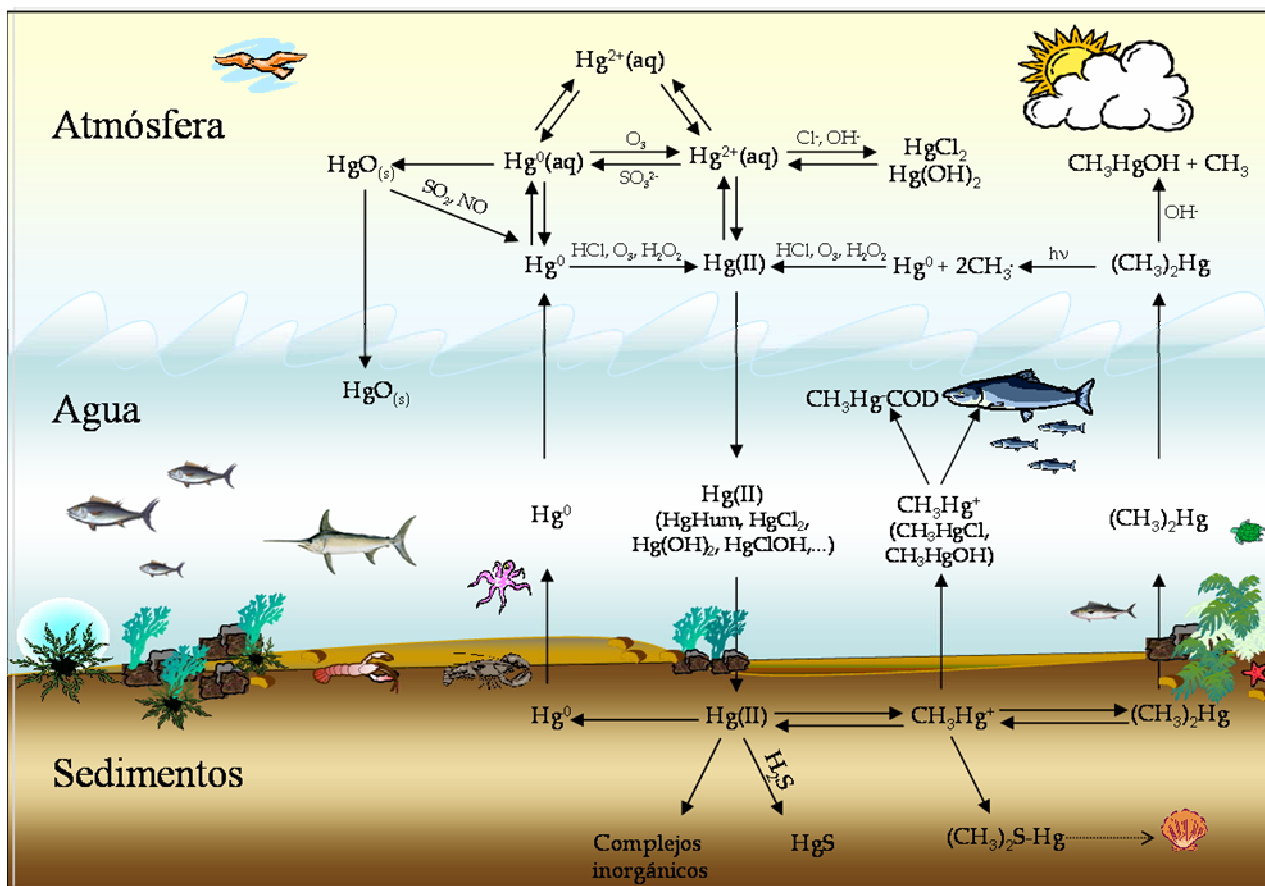
En la Tabla 2 aparecen recogidas las concentraciones de Hg total en distintas matrices medioambientales.

**Tabla 2.** Concentraciones medias de mercurio total en diferentes muestras medioambientales

	<b>Medios</b>	<b>Mercurio total</b>
Aire	Medio rural	1-10 ng m <sup>-3</sup>
	Medio urbano	50-170 ng m <sup>-3</sup>
Agua de lluvia	Medio rural	4-90 ng l <sup>-1</sup>
	Medio urbano	100-1000 ng l <sup>-1</sup>
Agua	Océano no contaminado	0.5-5 ng l <sup>-1</sup>
	Río no contaminado	< 5 ng l <sup>-1</sup>
	Río contaminado	10-200 ng l <sup>-1</sup>
	Lagos ricos en ác. húmicos	1-20 ng l <sup>-1</sup>
Suelos	No contaminado	< 200 ng g <sup>-1</sup>
	Contaminado	0.2- 100 µg g <sup>-1</sup>
Sedimentos	Océano no contaminado	50-500 ng g <sup>-1</sup>
	Océano contaminado	1-100 µg g <sup>-1</sup>
	Bahía de Minamata	908 µg g <sup>-1</sup>
	Río contaminado	50-200 µg g <sup>-1</sup>
Peces	Sin contaminar (río)	0.2-1 µg g <sup>-1</sup>
	Sin contaminar (océano)	0.01-1 µg g <sup>-1</sup>
	Contaminados	1-10 µg g <sup>-1</sup>

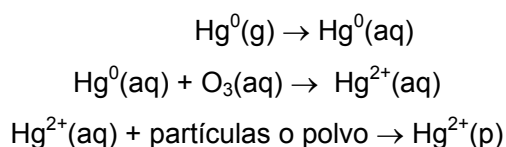
### 1.3. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO

Como se ha comentado, los compuestos de mercurio están muy distribuidos en los distintos compartimentos o estadios que completan su ciclo global. La concentración, transformación, movilidad y acumulación de mercurio en un estadio dado dependerá de numerosos factores tales como el pH, la temperatura, presencia de componentes orgánicos, así como de las actividades microbianas y antropogénicas. El conjunto de estos procesos constituye el ciclo biogeoquímico del elemento que se esquematiza en la Figura 1.



**Figura 1.** Distribución del Hg en los diferentes compartimentos medioambientales

Las reacciones de transformación de las especies de mercurio presentes en la atmósfera rigen, de un modo general, la distribución y deposición del mercurio. El principal mecanismo de transformación entre especies es la oxidación del  $Hg^0$  por el ozono ( $O_3$ ), que ocurre mayoritariamente en las gotas de agua de las nubes<sup>47</sup>.



Otros mecanismos de oxidación/reducción del mercurio por los radicales/especies:  $\cdot OH$ ,  $HOCl/OCl\cdot$ ,  $HO\cdot_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO_3\cdot$  se dan también en la atmósfera, pero en menor extensión.

La especie divalente del mercurio, que tiene una constante de Henry mucho más pequeña que el mercurio vapor, pasa mucho más fácilmente a la fase acuosa y se deposita por acción de la lluvia. Este proceso es el mayoritario, pero como se ha indicado existen otros, como la deposición del mercurio divalente por deposición seca. Por el

contrario, el mercurio vapor no se deposita por vía húmeda o seca ya que tiene una alta presión de vapor y una baja solubilidad en agua.

Parte del  $\text{Hg}^{2+}$  depositado desde la atmósfera, es reducido a  $\text{Hg}^0$  y nuevamente volatilizado a la atmósfera, estableciéndose un flujo de  $\text{Hg}^0$ , en especial en aguas oceánicas, volatilizándose de nuevo desde la hidrosfera hacia la atmósfera. Este proceso es uno de los principales reguladores de la concentración de mercurio en las grandes masas de agua y puede tener lugar mediante dos mecanismos en función de la concentración de  $\text{Hg}^{2+}$  en el medio circundante. Cuando esta concentración es la natural, del orden de unos pocos picogramos, la reducción es debida a un proceso fotoquímico<sup>48</sup>, sin embargo en aguas contaminadas, con concentraciones de  $\text{Hg}^{2+}$  superiores a 50 pM, el mecanismo predominante es de naturaleza microbiana<sup>49</sup>. El mecanismo exacto de la fotorreducción se desconoce aunque se sabe que están implicados la materia orgánica disuelta (ácidos húmicos) y posiblemente el hierro y el manganeso presentes. Este tipo de reacciones producen unas concentraciones de  $\text{Hg}^0$  que van desde el 5% en aguas continentales al 40% en aguas marinas. El  $\text{Hg}^0$  se acumula en las aguas superficiales para posteriormente y, como consecuencia del gradiente de concentración, pasar de nuevo a la atmósfera<sup>50</sup>. Estudios recientes indican que también se producen reacciones de oxidación de  $\text{Hg}^0$  a mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) sobre todo en aguas marinas<sup>51</sup>, debido a la presencia de partículas de gran tamaño que actúan como catalizadores y de elevadas concentraciones de cloruro<sup>52</sup>.

La metilación de mercurio en las aguas naturales y sedimentos es otro de los procesos claves en el ciclo global del mercurio<sup>53</sup>. La metilación del mercurio se ve favorecida por la ausencia de oxígeno por ello tiene lugar mayoritariamente en las aguas anaerobias y sedimentos por procesos bióticos. También se han propuesto mecanismos alternativos abióticos con metilaciones a través de la materia orgánica disuelta (ácidos húmicos)<sup>54</sup> o transmetilaciones con otros derivados organometálicos de estaño y plomo<sup>55</sup>. Otros estudios han identificado bacterias reductoras de sulfuro *Desulfovibrio desulfiricans* como las principales responsables de la metilación en los sedimentos anóxicos<sup>56,57</sup>.

La cantidad neta de metilmercurio presente en las aguas es el resultado de un balance entre los procesos de metilación-demetilación. Éste último es también un proceso biológico que implica actividad bacteriana que opone resistencia a los organomercuriales y es factible por la presencia del gen organomercurial *liasa* que permite a la bacteria romper el enlace mercurio-carbono<sup>58</sup>. Ambos fenómenos dependen de la disponibilidad del carbono orgánico disuelto fácilmente degradable. El metilmercurio es un producto intermedio y el producto final es el dimetilmercurio, el cual es inestable a pH bajo, produciendo metilmercurio. Es por ello que esta especie sólo se encuentra en océanos a grandes profundidades, donde no hay luz y el pH es alto y no en superficies ni en aguas

continentales<sup>59</sup>. La concentración resultante de metilmercurio nunca excede el 10% del mercurio total en aguas oceánicas y el 20% en aguas continentales.

El metilmercurio es particularmente inquietante porque entra a formar parte de la cadena trófica, bioacumulándose, y por lo tanto biomagnificándose. De hecho, en muchos peces de agua dulce y salada, así como en mamíferos acuáticos, se han encontrado concentraciones de mercurio muy superiores a las de las aguas circundantes (factores de  $10^5$ - $10^6$ ).

## 2. IMPORTANCIA TOXICOLÓGICA DEL MERCURIO Y SUS DERIVADOS

El significado biológico del mercurio se limita a su toxicidad, ya que no se han encontrado evidencias de que sea un elemento esencial para el hombre, flora o fauna.

La toxicidad del mercurio depende de su forma química y, por lo tanto, los síntomas y signos varían según se trate de exposición al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos de mercurio, o a los compuestos orgánicos de mercurio (en particular los compuestos de alquilvercurio como sales de metilmercurio y etilmercurio). Los derivados orgánicos del mercurio y el mercurio vapor se han identificado en general, como especies más peligrosas que las especies inorgánicas dado que la permeabilidad de las membranas biológicas es mayor para éstos.

Debido a sus efectos adversos, junto a dos importantes episodios de contaminación por mercurio que tuvieron lugar al sur de Japón (Minamata, 1940-1960) y en Irak (1971-1972), se han realizado numerosos estudios sobre el metabolismo y los efectos tóxicos del mercurio en animales y seres humanos.

Las investigaciones de la última década muestran que los efectos tóxicos pueden generarse a concentraciones cada vez más bajas, y podrían afectar a más población mundial de lo que se había pensado. Por ello, el grado de toxicidad de estas sustancias, sobre todo la del metilmercurio, está actualmente en discusión.

### 2.1. COMPUESTOS INORGÁNICOS

De los compuestos inorgánicos, el catión  $\text{Hg}^{2+}$  es el que se considera más tóxico. La química del  $\text{Hg}^{2+}$  dentro de los seres vivos viene determinada por su alta tendencia a unirse a los grupos tiol que abundan en los diferentes tejidos, bloqueando de este modo grupos biológicos esenciales. En concreto, se une a los grupos  $-\text{SH}$  de los restos del aminoácido cisteína que constituye el centro catalítico activo de determinadas enzimas por lo que se inhibe su actividad.

La principal vía de llegada de estos compuestos a los seres vivos son las pequeñas partículas de polvo o aerosol, o también por su presencia en alimentos o agua<sup>60</sup>. La toxicidad de esta especie viene especialmente definida por su solubilidad y, por tanto, las especies menos solubles, como el  $\text{HgS}$  o  $\text{HgSe}$ , prácticamente no presentan toxicidad mientras que sales de cloruro del mercurio son las más tóxicas. La baja solubilidad incide directamente en la baja absorción de estas sales en el aparato digestivo, alrededor de un 7%. Sin embargo, estas mismas especies cuando llegan a través de aerosoles o también a través de la piel (uso de cremas para la cura de la sífilis) son absorbidas con coeficientes muy altos. Una vez incorporado a través del tracto gastrointestinal o la piel, el  $\text{Hg}^{2+}$  tiende

a acumularse en los riñones donde afecta a los túbulos renales proximales<sup>61</sup>, mientras que la acumulación en el cerebro y la placenta son mínimas. Se elimina en su mayor proporción por la orina, teniendo un periodo de residencia medio dentro del ser humano de unos 42 días<sup>62</sup>.

Los casos crónicos terminan desarrollando serias deficiencias renales, trastornos psíquicos, fatiga, pérdida de memoria, etc.

En cuanto a carcinogenicidad, la evaluación general del *IARC* (Internacional Agency for Research on Cancer, 1993) concluye que el mercurio metálico y los compuestos inorgánicos de mercurio no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad para los seres humanos (grupo 3).

## 2.2. MERCURIO ELEMENTAL

La volatilidad del mercurio elemental, así como su continua emisión derivada de la aplicación industrial de mercurio hacen de él un tóxico potencial.

La mayoría de la información que se posee de la toxicidad del mercurio vapor proviene de los estudios de exposiciones al mercurio en lugares de trabajo o accidentes, y son éstas también las principales causas de contaminación. Los efectos que tiene el mercurio vapor sobre la salud se revisaron ampliamente en una reunión del "Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud"<sup>63</sup>.

El mercurio vapor, siendo un gas monoatómico sin carga, tiene una alta difusibilidad y es soluble en lípidos, atravesando con gran facilidad las paredes celulares. Una vez que ha atravesado la pared celular, el mercurio elemental puede oxidarse en los tejidos corporales a la forma divalente inorgánica por medio de peróxido de hidrógeno y catalasa<sup>64</sup>. Este es el camino mayoritario de oxidación, aunque no el único. Una vez oxidado el  $\text{Hg}^0$ , el ion mercúrico  $\text{Hg}^{2+}$  es la especie tóxica, y la diferencia en las pautas de toxicidad que presenta con las intoxicaciones con el mercurio inorgánico que antes se han descrito son atribuidas a las diferencias en la movilidad y la deposición en los tejidos.

La vía principal de exposición al mercurio elemental es por inhalación de sus vapores. Cerca del 80% de los vapores inhalados es absorbido por los tejidos pulmonares. Este vapor también penetra con facilidad la barrera del cerebro y placenta y su neurotoxicidad está bien documentada. Sin embargo, la absorción intestinal de mercurio elemental es baja. El mercurio absorbido tiene un periodo de residencia medio de 58 días, aunque en el área del cerebro este periodo es sólo de 21 días. El mercurio así absorbido es eliminado en parte a través de la orina y una pequeña parte a través del aire exhalado.

Se han observado trastornos neurológicos y de comportamiento en seres humanos tras inhalación de vapor de mercurio elemental. La exposición aguda a niveles altos de

mercurio vapor ( $>1.000 \mu\text{g m}^{-3}$ ) puede causar neumonía y otros signos de daño pulmonar. Exposiciones más largas a niveles menores ( $100 \mu\text{g m}^{-3}$ ) dan lugar a gingivitis, temblores de manos y eretismo (desordenes de personalidad y psicológicos que incluyen delirio, alucinaciones, cambios de comportamiento, etc.).

Las exposiciones crónicas a niveles más bajos ( $25-100 \mu\text{g m}^{-3}$ ) están asociadas con síntomas más suaves como temblores casi imperceptibles, irritabilidad, insomnio o lasitud. También se ha observado disminución en la memoria a corto plazo o disminución de la velocidad de respuesta nerviosa. En estos niveles, el mercurio vapor produce afecciones renales.

Mucho se ha discutido en el mundo científico sobre los intervalos de exposición que proporcionan las amalgamas de mercurio que se utilizan en la reparación de las dentaduras<sup>65</sup> y, aunque no se ha llegado ningún resultado concluyente, se han encontrado correlaciones entre las superficies de estas amalgamas y los niveles de mercurio en orina<sup>66</sup>.

Lo que todavía constituye un misterio es cómo el mercurio vapor que se convierte a  $\text{Hg}^{2+}$  dentro de las paredes celulares puede actuar sobre la multitud de enzimas que determinan el comportamiento del ser humano. Ningún otro metal muestra semejante actividad sobre el sistema nervioso central y posiblemente muchas drogas alucinógenas no tengan efectos tan notorios<sup>67</sup>.

### 2.3. COMPUESTOS ORGANOMERCÚRICOS

Entre los compuestos orgánicos de mercurio, el metilmercurio ocupa un lugar especial porque gran parte de la población está expuesta a él, y su toxicidad está mejor caracterizada que la de otros compuestos orgánicos de mercurio. Se considera que, dentro del grupo de los compuestos orgánicos de mercurio, los compuestos de alquilmercurio (en particular, etilmercurio y metilmercurio) son similares en cuanto a toxicidad. En cambio, otros compuestos orgánicos de mercurio, como el fenilmercurio, se asemejan más al mercurio inorgánico en lo que respecta a toxicidad.

La bioquímica del metilmercurio en los seres vivos es muy similar a la del mercurio inorgánico, mostrando una alta afinidad por los grupos tiol presentes en los tejidos. Dentro de los seres vivos, el metilmercurio se encuentra unido a los grupos tioles tanto de grandes moléculas (proteínas) como de pequeñas (cisteína y glutanina). Los complejos con estas moléculas de bajo peso molecular son responsables de la alta movilidad que tiene el metilmercurio a través de tejidos y células, llegando fácilmente al cerebro.

El metilmercurio se absorbe eficazmente a través de la pared intestinal, pasando a la sangre y de ahí al resto de órganos y tejidos. Una vez en los diferentes órganos se



acumula y se va transformando poco a poco en mercurio a través de radicales libres que rompen el enlace mercurio-carbono. Hay tejidos en los que el metilmercurio se acumula más eficazmente que en otros. El pelo, con concentraciones de 200:1 con respecto a la sangre, o el cerebro (20:1) son dos ejemplos claros. Actualmente muchos grupos de investigación usan la concentración de mercurio y metilmercurio en el pelo como un indicador de la exposición e intoxicación de estos compuestos.

Este compuesto se caracteriza por atravesar rápidamente la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica, y además, es un neurotóxico que puede afectar muy negativamente el desarrollo del cerebro. Además, basándose en su evaluación general, el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*, 1993) considera que los compuestos de metilmercurio pueden ser carcinógenos para los seres humanos (grupo 2B).

El metilmercurio tiene por lo tanto, efectos adversos para los seres humanos y el medio ambiente. La característica más remarcable de la toxicidad del metilmercurio en animales en general y mamíferos en particular es el daño selectivo que causa al sistema nervioso central<sup>68</sup> y en menor medida al sistema periférico. El metilmercurio consigue acabar muy particularmente con una gran cantidad de neuronas del cerebelo, de la corteza visual y otras áreas. El origen de este fenómeno selectivo está todavía bajo estudio. Las principales patologías que presenta son de déficits sensoriales y motores, cambios en el comportamiento, ataxia muscular, pérdida de campos visuales y, en menor medida, espasmos que aparecen al continuar la intoxicación<sup>69</sup>.

Una vez prohibido el uso de metilmercurio como fungicida, tal y como se observó en Minamata y Niigata (Japón) el mayor riesgo para los humanos viene a través del consumo de pescado contaminado. El metilmercurio es particularmente inquietante porque sufre un proceso de bioacumulación a través de la cadena alimenticia que hace que de concentraciones de  $\text{ng l}^{-1}$  en aguas se pase a  $\mu\text{g g}^{-1}$  en los peces depredadores, siendo el consumo de éstos muy peligroso.

### **3. FUENTES DE EXPOSICIÓN DEL HOMBRE AL MERCURIO**

#### **3.1. EXPOSICIÓN OCUPACIONAL Y ACCIDENTES MEDIOAMBIETALES**

La exposición humana actual es un fiel reflejo de las fuentes naturales de mercurio, junto con el constante cambio que el hombre ha dado a este metal. La elevada producción, dispersión y acumulación de mercurio en el medio ambiente propicia el deterioro y la contaminación del mismo, lo cual representa un peligro potencial para la supervivencia de los seres vivos y el hombre. Esta situación ha generado la aparición en el ser humano de ciertos desórdenes clínicos ocasionados por la toxicidad de los compuestos de mercurio. La población más afectada está constituida por personas sometidas ambiental u ocupacionalmente a la inhalación de vapores metálicos, personas que ingieren alimentos contaminados o que habitan en áreas circunvecinas a fuentes contaminantes. Entre los metales pesados, el mercurio es el contaminante ambiental y/u ocupacional más peligroso no sólo por la gravedad de las enfermedades que causa sino por los efectos irreversibles que provoca en los seres humanos. Por lo tanto, es importante monitorizar clínica y toxicológicamente a los individuos que ocupacionalmente se encuentran expuestos a este metal; así como también, a las personas que habitan en zonas próximas a las industrias emisoras de Hg.

#### **EXPOSICIÓN OCUPACIONAL**

El Grupo de Expertos del Mercurio designado por la Organización Mundial de la Salud, en su última publicación en relación al mercurio, afirma: "El mayor riesgo para la salud humana derivado de la presencia del mercurio en la Naturaleza se centra en la exposición ocupacional a este metal" <sup>4</sup>.

Los ambientes de trabajo considerados como fuentes potenciales ocupacionales de exposición al mercurio incluyen: minería del cinabrio, plata y oro, industrias del cloro-álcali, y la industria relacionada con la manufacturación y/o uso de instrumentos que contengan mercurio líquido<sup>70</sup>, siendo la principal ruta de exposición ocupacional de mercurio la inhalación en fase vapor de las atmósferas de los puestos de trabajo<sup>71</sup>. Según RTES (Registro de los Efectos Tóxicos de las Sustancias Químicas)<sup>72</sup> un total de 151.947 trabajadores estuvieron potencialmente expuestos al mercurio o varios compuestos de mercurio en EEUU en el año 1998.

Algunos casos significativos de secuelas muy graves ocasionadas por la exposición ocupacional se detallan a continuación.

La capacidad para formar amalgamas fue la principal aplicación del mercurio en las antiguas civilizaciones. Fenicios y Cartaginenses (2.700 A.C.), que comercializaban Hg de las minas de Almadén (España) ya conocían el proceso de amalgamación y las propiedades tóxicas del mercurio, puesto que en ellas sólo trabajaban esclavos y criminales<sup>13</sup> debido a que la esperanza de vida media de un minero se encontraba en torno a los seis meses.

La primera apreciación de los efectos tóxicos del vapor de mercurio como riesgo laboral aparece en el trabajo de Ulrico Ellenber 'Von der Grifftigen Bensen Terupffen von Reiichen der metal' (1473) o 60 años más tarde en el escrito de Paracelso 'Von der Bergsucht und auderen Baykrnakheiten' (1553). Pero tal vez, la imagen más popular es la transmitida por Lewis Carrol en 'Alicia en el País de las Maravillas'. El famoso sombrerero loco no era sino una víctima del riesgo laboral por exposición al mercurio, y refleja la constatación de los efectos del envenenamiento habitual de estos artesanos que utilizaban soluciones de nitrato de mercurio para fabricar sombreros de fieltro.

La revolución industrial y tecnológica de los siglos XIX y XX trajo consigo un gran número de nuevas aplicaciones para el mercurio y muchos de sus compuestos, pero también otras tantas posibles vías de contaminación medioambiental y exposición ocupacional. La exposición de trabajadores a concentraciones de mercurio que excedían los límites máximos permitidos ( $25 \mu\text{g m}^{-3}$ ) ha ocasionado distintas patologías en distintos países.

La exposición de mujeres rusas empleadas de una fundición, donde la concentración del mercurio en aire era de  $80 \mu\text{g m}^{-3}$ , se asoció a un incremento significativo en el número de abortos si se compara con los valores "basales"<sup>63</sup>. En Italia, en una fábrica de lámparas, las mujeres expuestas a una concentración media de  $50 \mu\text{g m}^{-3}$  durante 4 años, y a una concentración de  $10 \mu\text{g}$  en los años sucesivos mostraron anomalías congénitas<sup>73</sup>. En Polonia, y teniendo en cuenta que los dentistas pueden estar expuestos al mercurio como resultado de la preparación de amalgamas dentales se llevó a cabo un estudio con 81 dentistas, y se detectó no sólo un incremento en el número de abortos, sino en la aparición de malformaciones (espina bífida)<sup>74</sup>.

## ACCIDENTES

El mercurio se conoce desde hace más de 3500 años, pero su uso se ha extendido a partir de la revolución industrial y en especial en los últimos 150 años.

En 1881 se descubrió que el sulfato de mercurio catalizaba la conversión de acetileno en acetaldehído<sup>13</sup>. Entre los años 1920 y 1950, una fábrica química japonesa empleó el mercurio como catalizador para la producción de acetaldehído y cloruro de

vinilo. El metilmercurio, un subproducto de estos procesos catalíticos, fue liberado a la Bahía de Minamata, en la costa suroeste de Kyushu (Japón)<sup>75</sup>. Este compuesto se concentró en el mar Shirunui, donde por la acción del plankton y otros microorganismos se bioacumuló a lo largo de toda la cadena trófica<sup>76,77</sup>. Los peces acumularon MeHg sin sufrir ningún síntoma de toxicidad, pero comenzaron a diagnosticarse misteriosos casos de enfermedades neurológicas en familias de pescadores y en los animales domésticos que con ellos vivían. Desgraciadamente, no fue hasta el año 1959 cuando descubrieron el origen de este desastre ecológico.

Durante cuatro décadas se liberaron cerca de 150 toneladas de MeHg, originando durante los años 60 y 70 la muerte de 61 personas y la hospitalización y posteriores secuelas para más de 2.200. Las principales patologías fueron daño crónico cerebral, retraso mental, enfermedades hepáticas, hipertensión y modificación del metabolismo de niños cuyas madres se expusieron a los peces contaminados. Se dio lugar a una enfermedad del sistema nervioso central conocida como "Enfermedad Minamata"<sup>78</sup>.

Un segundo caso epidémico de esta enfermedad se dio en Niigata (Japón) donde el pescado procedente del río Agano se contaminó de forma análoga, originando resultados catastróficos similares a los anteriormente descritos<sup>76,77</sup>.

A comienzos del siglo XX las potentes propiedades fungicidas de los compuestos organo-mercuriales llevaron a su uso en la industria y agricultura. El fenilmercurio se empleó extensamente como biocidas en la pulpa de papel y en las industrias de pintura de látex, y para tratar grano en agricultura.

Del uso del mercurio como fungicida también se derivan distintos episodios de contaminación detectados en Irak, Pakistán, Ghana, Rusia, Nuevo México y Guatemala<sup>79,80,81</sup>.

Uno de los mayores desastres para la salud humana por contaminación química tuvo lugar en Irak en el invierno de 1971-72. La importación de una gran cantidad de grano por la escasez producida por las inundaciones y el posterior tratamiento por error con metilmercurio como fungicida de este grano condujo a la hospitalización de cerca de 6.500 personas y la muerte, según las estadísticas oficiales, de 459 personas, aunque datos posteriores evaluaron un número mucho mayor<sup>82</sup>.

Desde entonces el metilmercurio ha sido prohibido como biocida en semillas y plantas y se ha eliminado en algunos de los procesos industriales en los que se usaba.

Al haber cada vez más conciencia sobre los posibles efectos perjudiciales del mercurio en la salud y el medio ambiente, el número de usos (de mercurio orgánico e inorgánico) así como la cantidad de mercurio utilizado han disminuido sustancialmente en muchos de los países industrializados, sobre todo durante las últimas dos décadas, aunque desgraciadamente, siguen dándose casos de envenenamiento.

Recientemente, el empleo de un producto de belleza fabricado en Méjico ha originado múltiples casos de envenenamiento, puesto que dicho producto contenía cloruro de mercurio (calomel) en concentraciones 6-8%<sup>83</sup>.

### 3.2. EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA DIETA: BIOACUMULACIÓN

Aunque las condiciones locales pueden influir en la exposición al mercurio de ciertas poblaciones, la mayoría de la población está expuesta principalmente al mercurio por medio de los alimentos.

Un factor muy importante de los efectos del mercurio en el medio ambiente es su capacidad para acumularse en organismos y ascender por la cadena trófica. Hasta cierto punto, todas las especies de mercurio pueden llegar a acumularse, pero el metilmercurio se absorbe y acumula más que otras especies.

El metilmercurio entra a formar parte de la cadena alimentaria y se acumula a través de ésta<sup>3</sup>, llegando a factores de  $10^5$ - $10^6$ . En una primera etapa, el metilmercurio es absorbido por el zooplancton y pequeños microorganismos presentes en los medios acuosos para después pasar a pescados y moluscos. En este proceso, se pasa de concentraciones en el agua de  $\text{ng l}^{-1}$  a concentraciones en los peces de  $\mu\text{g g}^{-1}$ . La explicación de esta bioacumulación frente al comportamiento de otras especies de mercurio no es totalmente conocida. Algunos estudios indican que la diferencia responde a que el mercurio inorgánico se une a las paredes de las membranas de las diatomeas marinas mientras que el metilmercurio se acumula en la parte soluble de las diatomeas<sup>84</sup>. Los organismos que se alimentan de estas diatomeas normalmente no asimilan las paredes celulares, con lo que excreta el mercurio inorgánico, quedándose con el metilmercurio. Se ha demostrado que otros organismos monocelulares y sus depredadores tienen un comportamiento parecido<sup>85</sup>. La biomagnificación que sufre en etapas superiores de la cadena alimentaria, sobre todo en peces, se explica considerando la alta especificidad de la absorción del metilmercurio en el intestino, mientras que el mercurio inorgánico es solamente absorbido en la interfase de microvilli, resultando una tasa mucho más baja de absorción<sup>86</sup>. Además, la mayor parte del metilmercurio forma enlaces covalentes con grupos sulfhidrilo proteico, con lo que la vida media de eliminación resulta larga (aproximadamente de dos años). Como consecuencia, se genera un enriquecimiento selectivo de metilmercurio (en comparación con el mercurio inorgánico) cuando se pasa de un nivel trófico al siguiente nivel trófico superior (Tabla 3).

**Tabla 3.** Biomagnificación de mercurio inorgánico y metilmercurio en la cadena alimentaria<sup>85</sup>

Nivel trófico	Mercurio Inorgánico	Metilmercurio	% Metilmercurio
Agua	10	1	10
Fitoplancton	10 <sup>5.7</sup>	10 <sup>5</sup>	15
Zooplancton	10 <sup>5.9</sup>	10 <sup>5.5</sup>	30
Pescados	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6.5</sup>	95

Por ello, la Organización Mundial de la Salud estableció como la fuente de exposición de metilmercurio más significativa a la dieta, particularmente la dieta a base de pescados y mariscos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Ingesta media diaria y retención de los compuestos de mercurio por la población general<sup>3,63</sup>

Fuente de exposición	Mercurio elemental vapor	Compuestos de mercurio inorgánico	Metilmercurio
Aire	0.030 (0.024)	0.002 (0.001)	0.008 (0.0064)
Alimentos	Pescado	0	0.600 (0.042)
	Otros	0	3.6 (0.25)
Agua potable	0	0.050 (0.0035)	0
Amalgamas dentales	3.8-21 (3-17)	0	0
<b>Total</b>	<b>3.9-21 (3-17)</b>	<b>4.3 (0.3)</b>	<b>2.41 (2.31)</b>

\*Nota: Datos estimados de la ingesta diaria en  $\mu\text{g día}^{-1}$  por la población general no expuesta ocupacionalmente al mercurio. Los números en paréntesis reflejan la cantidad estimada retenida en el cuerpo humano de un adulto.

En muchas partes del mundo, el pescado constituye un componente muy valioso de la dieta humana, ya que proporciona nutrientes (proteínas y ácidos grasos omega-3, entre otros) que, por regla general, no se encuentran en otras fuentes alimenticias. El pescado se suele exportar a diversas naciones de todo el mundo, a lugares muy alejados de su lugar de origen. Por lo tanto, la contaminación con mercurio de lagos, ríos y especialmente océanos constituye una importante amenaza para esta fuente de alimentos

y es una cuestión verdaderamente mundial, que afecta a las industrias pesqueras y a los consumidores de pescado de todo el mundo.

Los peces depredadores más grandes, como el lucio, tiburón, sierra, lucioperca americana, barracuda, atún, pez espada y aguja, así como las focas y ballenas dentadas, contienen las concentraciones más altas de mercurio. Los datos existentes indican que el mercurio está presente en todo el mundo (especialmente en peces) en concentraciones en algunos casos perjudiciales para los seres humanos.

Tales niveles han ocasionado que en algunos países se formulen recomendaciones sobre el consumo de pescado y, en algunos casos, de mamíferos marinos, para que la población, sobre todo los subgrupos vulnerables (como mujeres embarazadas y niños pequeños) reduzca o evite el consumo de ciertos tipos de pescado. No es probable que el consumo moderado de pescado (con niveles bajos de mercurio) ocasione exposiciones de consideración. En cambio, la población que consume grandes cantidades de pescados o mamíferos marinos contaminados puede quedar muy expuesta al mercurio y, por consiguiente, se encuentra en riesgo.

Existen muchos factores que determinan la exposición y el riesgo al metilmercurio del consumo de pescado, como entre otros, las diferentes especies de pescados consumidas, la cantidad, y la frecuencia de este consumo. Como es natural, hay una gran variabilidad entre diferentes personas en la alimentación y en concreto, en el consumo de pescado, lo que implica una gran variabilidad en la exposición a metilmercurio en la población. La dosis de referencia (RfD) es la cantidad de metilmercurio que tomada diariamente durante un periodo largo de tiempo, se considera que no tiene efectos adversos sobre la salud de los humanos, incluidas las subpoblaciones más sensibles. A una exposición igual o menor que la RfD no se esperan efectos sobre la salud. Actualmente el RfD determinado por la Agencia de Protección Medioambiental de los EEUU (US-EPA)<sup>87</sup> basado en los estudios derivados a raíz de la intoxicación sufrida por la población iraquí en 1971 es de  $1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ . Estudios realizados más recientemente<sup>88</sup> con poblaciones de las Islas Seychelles, cuya ingesta de metilmercurio se puede asemejar a la que podría sufrir cualquier otra población a través del consumo pescado, aconsejan bajar esos límites a  $0.5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  o incluso menores<sup>89</sup>, como actualmente ha establecido la Unión Europea ( $0.3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ).

En la actualidad además del consumo directo de pescado se ha de tener en cuenta que se emplean productos derivados de la pesca en la alimentación animal debido a su alto contenido en minerales y a que proporciona una fuente rica de proteínas. La utilización de harinas de pescado en la crianza de aves ha supuesto una serie de ventajas como: rápido crecimiento y mejor conversión del alimento, incremento de la inmunidad, mejor desarrollo del sistema nervioso y estructura ósea, etc. Por ello, la presencia de mercurio en productos de consumo animal está aumentando considerablemente.

El empleo de piensos que contengan harinas de pescado puede originar niveles de mercurio no deseados, puesto que incluso bajos niveles de mercurio pueden causar su acumulación por encima de  $0.033 \text{ mg kg}^{-1}$  (límite permitido en la mayoría de los países para alimentos no derivados de la pesca)<sup>90</sup>. Por lo tanto, la carne procedente de animales alimentados con productos derivados de la pesca podría contribuir a la exposición del hombre al mercurio<sup>91</sup>. De hecho, este tipo de exposición podría explicar los altos valores de MeHg encontrados en individuos con un bajo consumo de pescado y también la posible influencia del consumo de aves alimentadas con harinas de pescado en las concentraciones de MeHg encontrada en cordón umbilical humano en un estudio realizado en Suecia<sup>92</sup>.



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- <sup>1</sup> *Expert panel on Mercury Atmospheric Processes*, 1994, Mercury atmospheric processes: a synthesis report. EPRI Report No TR-104214. Electric Power Research Institute, Palo Alto, California.
- <sup>2</sup> Mason R.P., Fitzgerald W.F., Morel M.M., *Geochem. Cosmochim. Acta*, 1994, 58, 3191.
- <sup>3</sup> WHO (World Health Organization), *Methylmercury Vol. 101, IPCS International Program on Chemical Safety*, 1990, World Health Organization, Ginebra.
- <sup>4</sup> *Evaluación mundial sobre el mercurio. Programa de las naciones unidas para el medio ambiente*, 2002, PNUMA Productos Químicos, Ginebra, Suiza.
- <sup>5</sup> Mason R.P., Reinfelder J.R., Morel F.M.M., *Mercury as a global pollutant. Proceedings of the Third International Conference Whistler, British Columbia: Bioaccumulation of mercury and methylmercury*, 1995, pp 915-921. Porcella D.B., Wheatley B. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Boston, EEUU.
- <sup>6</sup> Camargo J.A., *Chemosphere*, 2002, 48, 51.
- <sup>7</sup> Stein E.D., Cohen Y., Winer A.M., *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 1996, 26(1), 1.
- <sup>8</sup> Bullock O.R., *Langrangian modelling of mercury air emission, transport and deposition: An analysis of model sensitivity to emissions uncertainty*, 1997, Atmospheric Sciences Modelling Division Air Resources Laboratory, National Oceanic and Atmospheric Administration, Research Triangle Park, NC.
- <sup>9</sup> Boening D.W., *Chemosphere*, 2000, 40, 1335.
- <sup>10</sup> Schroeder W.H., Munthe J., *Atmospheric Environ.*, 1998, 32(5), 809.
- <sup>11</sup> Lin S., Pehkonen S.O., *Atmospheric Environ.*, 1999, 33, 2067.
- <sup>12</sup> Rasmussen P.E., *Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, 2233.
- <sup>13</sup> Clarkson T.W., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1997, 34(3), 369.
- <sup>14</sup> Lindqvist O., Jernelöv A., Johansson D., Rodhe H., *Mercury in the Swedish environment: global and local sources*, 1984, SNV PM 1816, Swedish Environmental Protection Board, S-171 85 Solna, Sweden.
- <sup>15</sup> Gavis J., Ferguson J.F., *Water Res.*, 1972, 6, 986.
- <sup>16</sup> Varemkap J.C., Buseck P.R., *Appl. Geochem.*, 1986, 1, 65.
- <sup>17</sup> Fitzgerald W.F., *Mercury Emissions from Volcanoes*, 1996, 4<sup>th</sup> International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Book of Abstract. Hamburg, Agosto 4-8.
- <sup>18</sup> Kim K.H., Lindberg S.E., Meyers T.P., *Atmos. Environ.*, 1995, 29, 267.
- <sup>19</sup> Advokaat E.M., Lindberg S.E., *Effect of Rainfall Exclusion on Air/Surface Exchange Rates of Mercury Over Forest Soils*, 1996, 4<sup>th</sup> International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Book of Abstract. Hamburg, Agosto 4-8.
- <sup>20</sup> Lindberg S.E., Meyers T.P., Munthe J., *Water, Air and Soil Pollut.*, 1996, 85, 2265.
- <sup>21</sup> Fleck J.A., Grigal D.F., Nater E.A., *Water, Air and Soil Pollut.*, 1999, 115, 513.

- <sup>22</sup> Lacerda L.D., Prieto R.G., Marins R.V., Azevedo S.L.C., Pereira M.C., *Anthropogenic Mercury Emissions to the Atmosphere in Brazil*, 1995, Proceeding of International Conference on Heavy Metals in the Environment. Hamburg.
- <sup>23</sup> Ebinghaus R., Tripathi R.M., Wallschläger D., Lindberg S.E., *Mercury Contaminated Sites: Natural and Anthropogenic Mercury Sources and Their Impact on the Air-Surface Exchange of Mercury on Regional and Global Scales*, 1999, Ebinghaus R., Turner R.R., de Lacerda L.D., Vasiliev O., Salomons W. (Eds). Springer-Verlag, Berlin.
- <sup>24</sup> Lindberg S., Brooks S., Lin J., *Abstracts of Papers of American Chemical Society 222 66-envr*, 2001 part 1 Agosto.
- <sup>25</sup> Vandal G., Fitzgerald W.F., Rolffhus K., Russ C., Lamborg C., *Sources and Cycling of Mercury and Methylmercury in Long Island Sound: Preliminary Results*, 1996, 4<sup>th</sup> International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Book of Abstracts. Hamburg, Agosto 4-8.
- <sup>26</sup> Schroeder W.H., *Global and Regional Mercury Cycles. Sources, Fluxes and Mass Balances: Estimation of Atmospheric Input and Evasion Fluxes to and from the Great Lakes*, 1996, Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- <sup>27</sup> Cossa D., Coquery M., Gobeil C., Martin J.M., *Global and Regional Mercury Cycles. Sources, Fluxes and Mass Balances: Mercury Fluxes at Ocean Margins*, 1996, Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- <sup>28</sup> Ebinghaus R., Krüger O., *Global and Regional Mercury Cycles. Sources, Fluxes and Mass Balances: Emission and Local Deposition Estimates of Atmospheric Mercury in North Western and Central Europe*, 1996, Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- <sup>29</sup> Lindberg S.E., *Nature*, 1977, 268, 133.
- <sup>30</sup> Fitzgerald W.F., *Global Biogeochemical Cycling of Mercury*, 1996, Presentado en la reunión de la DOE/FDA/EPA sobre Metilmercurio y Salud. Bethesda.
- <sup>31</sup> Slemr F., Schuster G. Sëller W., *J. Atmospheric Chem.*, 1985, 3, 407.
- <sup>32</sup> Schroeder W. H., Yarwood G., Niké H., *Water, Air and Soil Pollution*, 1991, 56, 653.
- <sup>33</sup> Morel F.M.M., Kraepiel A.M.L, Amyot M., *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1998, 29, 543.
- <sup>34</sup> Fitzgerald W.F., Mason R.P., *Metal Ions Biol. Syst.*, 1997, 34, 53.
- <sup>35</sup> Petersen G., Iverfelt Å., Munthe J., *Atmospheric Environ.*, 1995, 29, 47.
- <sup>36</sup> Porcella D.B., Chu P., Allan M.A., *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances: Inventory of North American Mercury Emissions to the Atmosphere: Relationships to the Global Mercury Cycle*, 1996, Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- <sup>37</sup> Swedish EPA. *Mercury in the Environment: Problems and Remedial Measures in Sweden*, 1991.

- <sup>38</sup> Carpi A., Lindberg S.E., *Environ. Sci. Tech.*, 1997, 31, 2085.
- <sup>39</sup> Schuster E., *Water, Air and Soil Pollut.*, 1991, 56, 667.
- <sup>40</sup> Barnett M.O., Harris L.A., Turner R.R., Stevenson R.J., Henson T.J., Melton R.C., Hoffman D.P., *Environ. Sci. Tech.*, 1997, 31, 3037.
- <sup>41</sup> Revis N.W., Osborne T.R., Holdsworth G., *Water Air Soil Pollut.*, 1989, 45(1-2), 105.
- <sup>42</sup> Revis N.W., Osborne T.R., Holdsworth G., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, 19, 221.
- <sup>43</sup> Bloom N.S., Watras C.J., *Sci. Tot. Environ.*, 1989, 87, 199.
- <sup>44</sup> Dryssen D., Wedboorg M., *Water, Air and Soil Pollut.*, 1991, 56, 507.
- <sup>45</sup> Jay J.A., Morel F.M.M., Hemond H.F., *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34, 2196.
- <sup>46</sup> Hintelmann H., Welbourn P.M., Evans R.D., *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 489.
- <sup>47</sup> Munthe J., *Atmos. Environ.*, 1992, 26A, 1461.
- <sup>48</sup> Amyot M., Lean S., Mirele G., *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, 16, 2054.
- <sup>49</sup> Manson R.P., Morel F.M.M., Hemond H.F., *Water, Air and Soil Pollut.*, 1995, 80, 775.
- <sup>50</sup> Fitzgerald W.F., Vandal G.M., Mason R.P., Dulac F., *Mercury Pollution, Integration and Synthesis: Air-Water Cycling of Mercury in Lakes*, 1994, Watras C.J., Huckabee J.W. (Eds). CRC Press. Boca Raton.
- <sup>51</sup> Yamamoto M., *Chemosphere*, 1996, 32, 1217.
- <sup>52</sup> Amyot M., Gill G.A., Morel F.M.M., *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 321, 3606.
- <sup>53</sup> Ullrich S.M., Tanton T.W., Abdrashitova S.A., *Critical Rev. Environ. Sci. Tech.*, 2001, 31, 241.
- <sup>54</sup> Weber J.H., *Chemosphere*, 1993, 26, 2063.
- <sup>55</sup> Wood J.M., *Heavy Metals in the Aquatic Environment: Metabolic Cycles for Toxic Elements in the Environment*, 1975, Krenkel P.A. (Ed). Pergamon Press, Oxford.
- <sup>56</sup> Compeau G.C., Bartha R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 53, 498.
- <sup>57</sup> King J.K., Harmon S.M., Fu T.T., Gladden J.B., *Chemosphere*, 2002, 46, 859.
- <sup>58</sup> Oremland R.S., Culberston C.W., Winfrey M.R., *Appl. Environ. Microb.*, 1991, 57(1), 130.
- <sup>59</sup> Mason R.P., Sullivan K.A., *Deep-Sea Res. Part II- Top. Stud. Oceanogr.*, 1999, 46, 937.
- <sup>60</sup> Ratcliffe H.E., Swanson G.M., *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, 49, 221.
- <sup>61</sup> Casas J.S., Moreno V., Sánchez A., Sánchez J.L., Sordo J., *Química bioinorgánica: Introducción a la toxicología metálica: Cd, Hg y Pb*. Ed. Síntesis.
- <sup>62</sup> Rahola T., Hattaula T., Korolainen A., *Ann. Clin. Res.*, 1973, 5, 214.
- <sup>63</sup> WHO (World Health Organization), *Environmental Criteria 118: Inorganic Mercury* 1991, World Health Organization, Ginebra.
- <sup>64</sup> Sichak S.P., Mavis R.D., Finkelstein J.N., Clarkson T.W., *J. BioChem. Tox.*, 1986, 1, 53.

- <sup>65</sup> Committee to Coordinate Environmental Health and Related Programs. *Dental Amalgam: a Public Health Service Strategy for Research, Education and Regulation*, 1992, Subcommittee on Risk Management. U.S. Public Health Service, Washington D.C.
- <sup>66</sup> Skare I., Engqvist A., *Arch. Environ. Health*, 1994, 49, 384.
- <sup>67</sup> Clarkson W., *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 1998, 11, 303.
- <sup>68</sup> Wolfe M.F., Schwarzbach S., Sulaiman R.A., *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, 17, 146.
- <sup>69</sup> Eto K., *Tox. Pathol.*, 1997, 25, 614.
- <sup>70</sup> Stokinger H., *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 1981, pp 1769-1792. Clayton G.D., Clayton F.E. (Eds). John Wiley & Sons, Nueva York.
- <sup>71</sup> NIOSH-TR-044-73. *Criteria for recommended standard: Occupational exposure to inorganic mercury*, 1973, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD.
- <sup>72</sup> RTECS. *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)*, 1998, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Computer database online.
- <sup>73</sup> De Rosis F., Anastasio S.P., Selvaggi L., Beltrame A., Moriani G., *Br. INdMed*, 1985, 42, 488.
- <sup>74</sup> Sikorski R., Juszkiewicz T., Paszkowski T., Szprengier-Juszkiewicz T., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1987, 59, 551.
- <sup>75</sup> Tsubaki T., Irukayama K., *Minamata Disease*, 1977, Kodansha Ltd, Tokio.
- <sup>76</sup> Powell P.P., *South Med. J.*, 1991, 84, 1352.
- <sup>77</sup> Harada M., *Crit. Rev. Toxicol.*, 1995, 25, 1.
- <sup>78</sup> Graeme K.A., Pollack C.V., *J. Emerg. Med.*, 1998, 16, 45.
- <sup>79</sup> Zepp E.A., Thomas J.A., Knotts G.R., *Clin Pediatr.*, 1974, 13, 783.
- <sup>80</sup> Gotelli C.A., Astolfi E., Cox C., Cernichiari E., Clarkson T.W., *Science*, 1985, 227, 638.
- <sup>81</sup> Igata A., *Environ Res.*, 1993, 63, 157.
- <sup>82</sup> Greenwood M.R., *J. Appl. Toxicol.*, 1985, 5, 148.
- <sup>83</sup> Villanacci J.F., Beauchamp R., Perotta D.M., *Arch. Dermatol.*, 1996, 13, 1533.
- <sup>84</sup> Mason R.P., Reinfelder J.R., Morel F.M.M., *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30, 1835.
- <sup>85</sup> Watras C.J., Bloom N.S., *Limnol. Oceanogr.*, 1992, 37, 1313.
- <sup>86</sup> Boudou A., Ribeyre F., *Metal Ions Biol. Syst.*, 1997, 34, 289.
- <sup>87</sup> *Mercury Study Report to Congress. Vol. V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds*. 1997, USEPA. (<http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume5.pdf>)
- <sup>88</sup> Davidson P.W., Myers G.J., Cox C., Axtell C., Shamlaye C., Sloane-Reeves J., Cernichiari E., Needham L., Choi A., Wang Y., Berlin M., Clarkson T.W., *JAMA*, 1998, 280, 701.
- <sup>89</sup> Clewell H.J., Gearhart J.M., Gentry P.R., Covington T.R., VanLandingham C.B., Crump K.S., Shipp A.M., *Risk Anal.*, 1999, 19, 547.

<sup>90</sup> Savage G.P., *Mercury in Fish and Fishmeals*, 1992, Trace Elements: Roles, risks and proceedings of the New Zealand trace elements group conference, 11-22.

<sup>91</sup> Lindberg A., Ask Bjornberg K., Vahter M., Berglund M., *Environ. Res.*, 2004, 96, 28.

<sup>92</sup> Ask Bjornberg K., Vahter M., Petersson-Grawé K., Glynn A., Cnattingius S., Darnerud P.O., Atuma S., Aune M., Becker W., Berglund M., *Environ. Med.*, 2003, 111, 637.

- 
- 1. SELENIO EN EL MEDIO AMBIENTE**
    - 1.1. EMISIONES**
    - 1.2. ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL**
    - 1.3. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL SELENIO**
  
  - 2. RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL SELENIO**
    - 2.1. ESENCIALIDAD**
    - 2.2. EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE SELENIO**
    - 2.3. EFECTOS DEL EXCESO DE SELENIO: TOXICIDAD DEL ELEMENTO**
    - 2.4. METABOLISMO DEL SELENIO EN ANIMALES SUPERIORES**
  
  - 3. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA Y SU BIODISPONIBILIDAD**
    - 3.1. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA**
    - 3.2. BIODISPONIBILIDAD DEL SELENIO**
  
  - 4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- 

**SELENIO: ELEMENTO ESENCIAL PARA LOS SERES VIVOS**

Capítulo II

## **SELENIO: ELEMENTO ESENCIAL PARA LOS SERES VIVOS**

El selenio (Se) es un elemento traza esencial de interés clínico y nutricional, cuyas funciones biológicas (antioxidante y catalítica) se ejercen a través de las selenoproteínas. Es necesario para el funcionamiento adecuado del sistema inmune, podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento del SIDA y parece ser un oligoelemento esencial para contrarrestar la virulencia de la hepatitis. Por otro lado, una ingesta adecuada de selenio puede prevenir el riesgo de padecer cáncer. Además, en el contexto de sus efectos sobre la salud, el bajo aporte de selenio en algunas partes del mundo, entre los que se encuentran algunos países europeos, es motivo de preocupación.

Por todo ello, es de gran interés el conocimiento de los diferentes procesos físicos, químicos y bioquímicos en los que este elemento y sus especies están implicados. Este hecho queda reflejado por el gran interés que el selenio está despertando en los últimos años en la comunidad científica por su incidencia en la salud pública.

### **1. SELENIO EN EL MEDIO AMBIENTE**

#### **1.1. EMISIONES**

Las fuentes que contribuyen a la presencia del elemento en la atmósfera pueden ser de origen natural o antropogénico.

Los procesos de emisión natural de selenio incluyen la erosión de las rocas y suelos, emisiones volcánicas y la actividad de microorganismos y plantas<sup>1</sup>. Por su parte, el gas volcánico es la más importante de las fuentes naturales seguido de los procesos de biometilación del selenio presente en suelos, plantas, aguas y sedimentos por la acción de bacterias, hongos, algas y plantas superiores que liberan compuestos volátiles de selenio fundamentalmente dimetilselenio (DMSe), aunque también dimetildiselenio (DMDS<sub>e</sub>) y otras especies similares<sup>2</sup>. Las emisiones naturales del selenio a la atmósfera constituyen un proceso fundamental dentro del ciclo biogeoquímico del selenio puesto que contribuyen entre 50 y 70% al flujo global del selenio<sup>3</sup>.

Las principales fuentes de selenio procedentes de la actividad antropogénica son: la combustión de carburantes fósiles, las fundiciones y refinerías, las fábricas de vidrio y cerámica, y otras industrias<sup>4,5</sup>. Otras emisiones proceden de la incineración de basuras<sup>6</sup>, o del humo de los cigarrillos, en los que se han encontrado niveles de 0.001-0.0063 µg Se cigarrillo<sup>-1</sup> <sup>7</sup>. Estas emisiones son mayoritariamente en forma de partículas diminutas de óxidos de selenio<sup>8</sup>.

Entre las fuentes antropogénicas, la combustión de carbón y combustibles fósiles es la principal fuente de incorporación del selenio al aire. Aunque en las combustiones se forma  $\text{SeO}_2$ , la presencia de  $\text{SO}_2$  hace que se reduzca con rapidez a selenio elemental, que se une a cenizas y a partículas atmosféricas.

De manera global se ha estimado en  $7700\text{-}8000 \text{ Tm año}^{-1}$  la cantidad vertida a la biosfera como resultado de la combustión de fósiles y de actividades industriales y agrícolas<sup>9</sup>. De hecho, a través de la agricultura se drena agua con un contenido medio de selenio de  $1.4 \mu\text{g l}^{-1}$ <sup>10</sup>, considerándose que el vertido de selenio al mar es de unas 800 toneladas anuales<sup>11</sup>. Sin embargo, no existen indicaciones de aumento global en la concentración de selenio en la atmósfera, posiblemente debido a una rápida sedimentación del selenio atmosférico<sup>12</sup>. Tampoco existen evidencias de aumento global de la concentración de selenio en el agua de mar, considerándose el valor de  $0.09 \mu\text{g l}^{-1}$  constante en el tiempo y el espacio.

La contaminación por selenio en los ecosistemas acuáticos es de especial interés en extensas zonas del planeta. En California y otras regiones semiáridas del oeste de América del Sur, los altos niveles encontrados ponen en peligro el futuro de la agricultura en estas zonas. Por ello, en la actualidad se están realizando distintos estudios encaminados a desarrollar métodos de recuperación de aguas y suelos contaminados por selenio mediante procesos biológicos y/o químicos<sup>13,14</sup>.

## 1.2. ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL

### ATMÓSFERA

En la atmósfera, el selenio puede estar presente en forma gaseosa, aunque, al igual que el resto de elementos de su grupo, tiende a concentrarse en partículas en suspensión que forman aerosoles muy finos, fáciles de inhalar y con un elevado tiempo de residencia en la atmósfera, de forma que pueden ser transportadas a distancias considerables de la fuente de emisión.

El selenio se emite de forma natural a la atmósfera en forma de alquilseleniuros volátiles, selenio elemental y dióxido de selenio, el cual puede sufrir transformaciones químicas responsables de la presencia de selenito y seleniato en el agua de lluvia, tales como: hidratación, reducción por la presencia de  $\text{SO}_2$  u oxidación por acción del oxígeno del aire<sup>15</sup>. Por lo tanto, las especies químicas de selenio presentes en los aerosoles dependerán, entre otros factores de la acidez del medio<sup>16</sup>. Además, el nivel de selenio en la atmósfera estará influenciado por factores estacionales (siendo mayor en verano que en invierno) así como por el clima y la altitud<sup>17</sup>.



El selenio que se encuentra en forma particulada no constituye generalmente una fuente de selenio disponible para plantas y animales. En el caso de las emisiones de selenio derivadas de combustiones, la mayor parte del selenio es reducido a  $\text{Se}^0$  y este se une a cenizas y a partículas atmosféricas siendo imposible su uso en sistemas biológicos. Sin embargo, el aire contiene pequeñas cantidades de compuestos de selenio volátiles, los cuales son producidos y utilizados por sistemas biológicos. El compuesto volátil predominante es dimetilselenio<sup>18</sup>.

La concentración media de selenio en la atmósfera se sitúa en el rango 0.1-10 ng  $\text{m}^3$  en función de su localización, pudiendo llegar a 500 ng  $\text{m}^3$  cerca de las fuentes de emisión, por lo general en áreas urbanas e industrializadas<sup>19</sup>. El valor umbral límite para compuestos de selenio en el aire es de 0.1-0.2 mg  $\text{m}^{-3}$ , excepto para el  $\text{H}_2\text{Se}$  que es de 0.5 mg  $\text{m}^{-3}$ , cantidades que se encuentran reguladas para zonas de exposición industrial<sup>20</sup>.

## SUELOS

El selenio se incorpora a los suelos por distintos mecanismos como: precipitación, adsorción en la superficie o absorción en minerales o materia orgánica<sup>21</sup>.

Las formas inorgánicas son las mayoritarias en suelos, si bien las especies concretas dependerán, sobre todo, de las condiciones redox, el pH y la presencia de microorganismos.

En suelos oxigenados alcalinos abundan generalmente los seleniatos, que son solubles, asimilables por las plantas y con mayor riesgo de lixiviación. Por el contrario, en los suelos ácidos con elevado contenido en materia orgánica como ácidos húmicos y fúlvicos predominan las formas reducidas (selenitos y seleniuros), que forman compuestos insolubles con  $\text{Fe}^{3+}$  y Al de baja biodisponibilidad<sup>22</sup>. La adsorción dependerá del pH, de la naturaleza de los minerales y de la presencia de otros aniones en el suelo que puedan actuar como competidores.

La acción microbiana puede transformar el selenio del suelo por oxidación, reducción o volatilización del mismo. Así, los microorganismos reducen las especies inorgánicas y producen selenio elemental o selenocompuestos orgánicos, algunos de los cuales son especies volátiles como DMSe (la principal especie volátil producida por microorganismos) o DMDS<sub>e</sub> que puede difundirse en la atmósfera<sup>23</sup>.

En la mayoría de los suelos las concentraciones de selenio varían entre 0.01 y 2  $\mu\text{g g}^{-1}$ <sup>24</sup>, correspondiendo los valores más bajos a zonas deficientes en este elemento, como Nueva Zelanda, China y Finlandia donde la concentración media suele ser de 0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Por el contrario, en áreas seleníferas, como Irlanda y parte de los Estados Unidos, las concentraciones suelen ser superiores a 80  $\mu\text{g g}^{-1}$ <sup>9,12</sup>, asociándose, por lo general, los

valores más elevados, a suelos formados a partir de materiales sedimentarios de origen marino<sup>25</sup>.

A menudo la concentración del elemento aumenta con la profundidad, la cercanía al mar y la presencia de materia orgánica, ya que los ácidos húmicos constituyen la principal reserva de selenio en los suelos<sup>26</sup>.

## AGUAS

El selenio se presenta en aguas naturales preferentemente como seleniato y en menor proporción como selenito, aunque también pueden formarse especies metiladas volátiles como resultado de transformaciones microbiológicas. Además puede encontrarse de manera particulada, debido a la presencia de productores primarios como el fitoplancton, bacterias, detritos, material inorgánico en suspensión y sedimentos<sup>27</sup>.

La disponibilidad del selenio en agua depende de distintas variables medioambientales como el pH, la salinidad, la dureza y la presencia de otras sustancias químicas. Por esto, la alteración de estas variables puede producir un cambio en los procesos de biotransformación.

En aguas alcalinas, aparecen sales solubles del ácido selénico, siendo el seleniato de sodio uno de los compuestos de selenio con mayor movilidad en el medio debido a su baja adsorción a las partículas del suelo. Al ser el selenioso un ácido débil, el ion biselenito es el predominante en aguas con un pH entre 3.5 y 9. Por su parte, a pHs bajos (<7) la presencia de hierro disminuye el nivel de selenio en agua debido a la precipitación del selenito férrico, que es insoluble, mientras que a pHs elevados (>7), tiene lugar la oxidación a seleniatos solubles, incrementándose la concentración normal de selenio en aguas por encima de  $10\text{-}400 \mu\text{g l}^{-1}$ <sup>28,29</sup>.

El nivel de concentración de selenio en aguas superficiales y subterráneas es generalmente bajo, entre  $0.02$  y  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ , si bien puede verse notablemente afectado por factores geológicos, llegando a superar los  $6 \text{ mg l}^{-1}$ <sup>28,30</sup>. En el medio marino, los niveles de selenio varían de la superficie a las profundidades en función de la especie; encontrándose valores de  $0.004$  y  $0.03 \mu\text{g l}^{-1}$  (en la superficie) y de  $0.06 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $0.12 \mu\text{g l}^{-1}$  (en las profundidades) para selenito y seleniato, respectivamente<sup>31</sup>. La fracción orgánica no ha sido caracterizada, aunque cabe esperar que existan selenoaminoácidos y sus derivados.

El nivel de selenio en agua constituye un importante criterio para determinar la idoneidad de la misma para diferentes usos, y es el compartimento ambiental donde el selenio se encuentra más controlado por la legislación. La Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas de consumo humano (DOCE L 330, de 5 de diciembre de 1998) y la Agencia Americana para la Protección de Medio

Ambiente (US-EPA) han fijado los niveles máximos de selenio permitidos en agua de bebida y de riego son  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  y  $20 \text{ ng ml}^{-1}$  respectivamente. Por su parte, el nivel máximo de selenio en el agua para la fauna está en  $5 \text{ ng ml}^{-1}$ , aunque ciertos autores han propuesto reducir dicho umbral hasta  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  debido a la posible bioacumulación del elemento, que podría poner en peligro la salud de ciertos mamíferos y pájaros especialmente sensibles al selenio<sup>32</sup>.

## PLANTAS

En las plantas, el selenio se encuentra en forma de compuestos orgánicos, fundamentalmente como selenometionina (SeMet). En granos de cereales la SeMet constituye el 50% del selenio total<sup>33</sup>. Otros compuestos identificados en plantas son seleno-metil-selenometionina (Se-metil-SeMet), selenocistina (SeCys<sub>2</sub>) y seleno-metil-selenocistina (Se-metil-SeCys<sub>2</sub>)<sup>34</sup>.

Las plantas son capaces de incorporar selenio (a partir del suelo, agua o atmósfera), transportarlo y metabolizar distintas especies del elemento, empleando para todo ello mecanismos análogos a los del azufre. La capacidad para absorber, acumular y metabolizar selenio varía de unas especies a otras. Así, existen diferencias sustanciales en cuanto a la concentración y tolerancia en función de la especie vegetal<sup>35</sup>. Existen especies de plantas acumuladoras de selenio, generalmente no comestibles, que crecen en suelos seleníferos y pueden alcanzar concentraciones de entre  $100$  y  $10000 \mu\text{g g}^{-1}$ . En estas plantas la concentración de selenio llega a ser superior a la del suelo en el que crecen. En este grupo se incluyen varias especies del género *Astragalus*, la *Oonopsis condensaya* y la *Stanleya pinnata* entre otras, mientras que en plantas no acumuladoras, entre las que se encuentra la mayoría de las plantas de cultivo, el contenido en selenio varía entre  $0.05$ - $1 \mu\text{g g}^{-1}$ <sup>5, 36</sup>.

La absorción de selenio tiene lugar preferentemente en forma de  $\text{SeO}_4^{2-}$ , anión que interfiere en las reacciones bioquímicas esenciales de las plantas, al sustituir al azufre e incorporarse a los aminoácidos proteicos para formar selenocisteína (SeCys) y selenometionina<sup>35,37</sup>. En el caso de las plantas acumuladoras, el selenio se incorpora a aminoácidos no proteicos por lo que no interfiere en el metabolismo de las mismas.

En algunas ocasiones, los compuestos de selenio son transformados por plantas y algas a formas volátiles (DMSe, DMDS<sub>e</sub> y dietilselenio (DESe)) como mecanismo de defensa frente a la toxicidad<sup>38</sup> observándose importantes diferencias en cuanto a las especies volatilizadas en función de la especie vegetal. Las plantas acumuladoras producen DMDS<sub>e</sub>, mientras que las no acumuladoras volatilizan una menor cantidad de selenio en forma de DMSe<sup>39,40</sup>. Tal es la importancia del selenio para el desarrollo de las

plantas y su influencia en la cadena trófica, que incluso algunos países han tomado la decisión de incorporarlo artificialmente a sus suelos cuando éstos son deficitarios. Así, el hecho de que sólo un 5% del selenio del suelo de Finlandia fuera disponible para las plantas, motivó que se incorporara artificialmente en forma de seleniato en los fertilizantes de este país<sup>41</sup>.

En la Tabla 5 aparecen recogidas las concentraciones de selenio total en algunas matrices medioambientales.

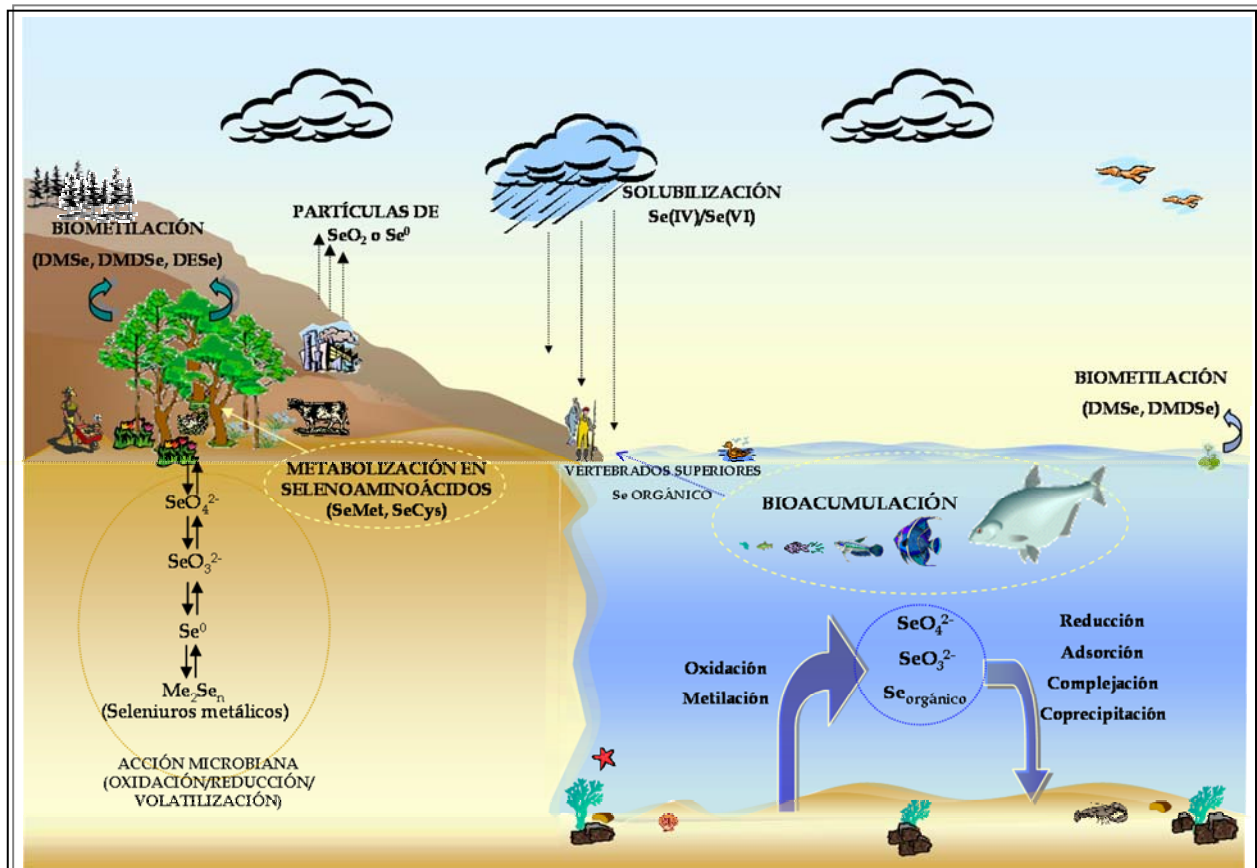
**Tabla 5.** Concentraciones de selenio total en algunas matrices medioambientales<sup>12</sup>

<b>Matriz</b>		<b>Contenido de Se (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
<b>Corteza terrestre (promedio)</b>		0.09
<b>Rocas</b>	ígneas	0.05
	arenisca	0.05
	piedra caliza	0.08
<b>Combustibles fósiles</b>	carbón	0.47-8.1
	aceite	2.4-7.5
<b>Suelos</b>	normal	0.1-0.4
	seco	0.01-2
	selenífero	40.0-80.0
<b>Plantas</b>	marinas	0.8
	césped inglés	0.01-3.3
	trébol	0.13
<b>Agua</b>	de mar (Pacífico Norte)	0.06-0.12
	de lago (cerca California)	0.08
	de río	0.085-0.37
	de lluvia (California)	0.052
	de grifo	0.16

### 1.3. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL SELENIO

Para conocer el comportamiento del selenio en el medioambiente es necesario estudiar las biotransformaciones que conforman su ciclo biogeoquímico, lo que implica conocer su disponibilidad geológica y su química orgánica e inorgánica, así como la actividad biológica de los organismos que utilizan este elemento.

La concentración, transformación, movilidad y acumulación de selenio en un ambiente dado depende de numerosos factores tales como el pH, las condiciones redox, la temperatura, la presencia de determinadas materias minerales, así como de la actividad microbiana y antropogénica<sup>42</sup>. El conjunto de estos procesos está esquematizado en la figura 2. En dicho ciclo se indican algunas de las especies identificadas en los distintos compartimentos ambientales. No obstante, muchas especies de selenio y sus mecanismos bioquímicos son aún desconocidos.



**Figura 2.** Distribución del Se en los diferentes compartimentos medioambientales

El selenio puede moverse y concentrarse por desgaste del suelo y evaporación posterior o por deposición del agua de lluvia en climas áridos y semiáridos. Las sales de  $\text{SeO}_4^{2-}$  son muy solubles en agua, siendo este anión el predominante en disoluciones de los suelos básicos bien drenados. Las sales de  $\text{SeO}_3^{2-}$  son menos solubles y además se adsorben fácilmente en las partículas de suelo, por lo que su movilidad en ecosistemas acuáticos está muy limitada, al contrario que el seleniato, que además entra en la cadena trófica a través de las plantas. Por otro lado, el selenio elemental,  $\text{Se}^0$ , es muy insoluble en agua y tiene una cinética extremadamente lenta, por lo que es frecuente su presencia en

forma particulada en medios oxidantes a pesar de ser termodinámicamente inestable en ellos<sup>43</sup>.

Las transformaciones microbianas del selenio pueden afectar a la biodisponibilidad de este elemento respecto a plantas y animales<sup>44,45</sup>. Las bacterias anaeróbicas pueden utilizar  $\text{SeO}_4^{2-}$  como aceptor final de electrones en su respiración (reducción disimilatoria) y de esta forma reducirlo a  $\text{SeO}_3^{2-}$  y en último término a  $\text{Se}^0$ <sup>46</sup>. También se ha observado la reducción microbiana de  $\text{SeO}_4^{2-}$  a  $\text{SeO}_3^{2-}$  y finalmente a  $\text{Se}^0$  en procesos no relacionados con la respiración, posiblemente como mecanismos de detoxificación<sup>45,47</sup>. Los microorganismos también son capaces de volatilizar selenio en las formas DMSe y DMDSSe tras la reducción del selenio presente en el medio externo a seleniuro orgánico. El proceso de metilación microbiana del selenio parece tener una función detoxificadora<sup>48</sup>.

La transferencia de selenio desde el medioambiente al hombre y animales procede principalmente de dos vías: inhalación e ingestión. La incorporación de este elemento a través del aire es muy baja, proporcionando al cuerpo alrededor de  $0.02 \text{ ng g}^{-1}$ , mientras que la ingestión de agua y alimentos produce del orden de  $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ <sup>5</sup>. Existe evidencia de que el selenio puede acumularse en los tejidos corporales de los organismos y puede ser transportado en la cadena alimenticia hacia niveles superiores. Normalmente esta biomagnificación de selenio comienza cuando los animales ingieren plantas o invertebrados inferiores con un elevado contenido en selenio. Algunos estudios indican que la ingesta de la fracción de selenio disuelta por los invertebrados inferiores (como el zooplancton y los bivalvos) es despreciable frente a la fase particulada, postulándose que la entrada de este analito en la cadena trófica tiene lugar de esta manera<sup>49</sup>. Por ello, el estudio de la bioacumulación de selenio en estos invertebrados suele considerarse como factor crítico en la determinación de sus efectos en los organismos superiores, ya que los predadores superiores (como peces y pájaros) se alimentan de los mismos.

Los mayores aportes de selenio en el hombre proceden del consumo de vegetales, pescados y mariscos debido a que su capacidad de bioconcentración alcanza un factor de 400.

## **2. RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL Se**

### **2.1. ESENCIALIDAD**

La evidencia de los efectos beneficiosos del selenio para los seres vivos es relativamente reciente, fue descrita por primera vez en 1957 por Schwartz y Foltz<sup>50</sup>, que constataron que el selenio protegía a ratas deficientes en vitamina E de necrosis hepática y a pollos de diatesis exudativa y degeneraciones necróticas. Pero su esencialidad

nutricional no se demostró hasta 1973 cuando se comprobó su función bioquímica en animales<sup>51</sup>. Se descubrió una función biológica importante del selenio debida a su acción reductora, a través de la selenocisteína presente en la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Desde entonces se han identificado otras funciones bioquímicas y fisiológicas del selenio relacionadas con su presencia como selenoproteínas en los tejidos y los fluidos biológicos de los mamíferos. El número de selenoproteínas en estos animales ha sido estimado entre 30 y 50<sup>52</sup>. En la actualidad se han identificado unas 35 selenoproteínas, de ellas, 18 han sido secuenciadas<sup>53</sup> y se conoce la función enzimática de más de 10.

En la Tabla 6 se muestra un resumen de las principales selenoproteínas identificadas.

**Tabla 6.** Principales selenoproteínas identificadas en seres vivos

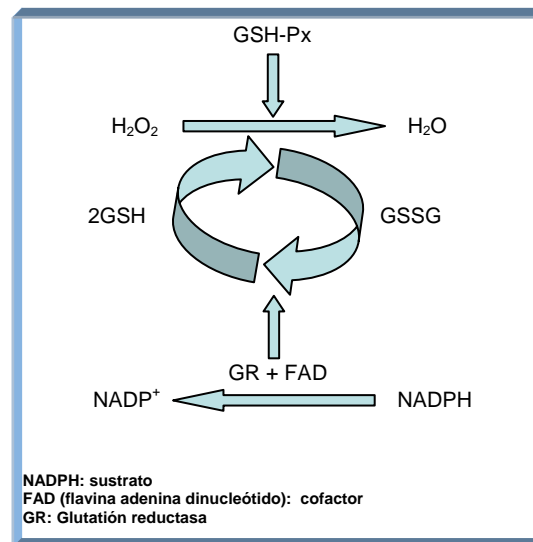
<b>Selenoproteína</b>	<b>KDa</b>	<b>Funciones</b>	<b>Localización</b>
<b>Glutatonas Peroxidasas</b>		Antioxidante	
Glutaciona celular (GPx1)	88	Antioxidante y reserva de Se	Citosol
Glutaciona gastrointestinal (GPx2)	(22x4)	Antioxidante (protección frente hidroperóxidos lipídicos)	Tracto gastrointestinal, hígado
Glutaciona plasmática (GPx3)	88	Antioxidante	Plasma, leche materna, riñón
Fosfolípido hidroperoxidasa (GPx4)	19	Antioxidante (protección frente hidroperóxidos lipídicos en membrana celular)	Membrana celular, núcleo, citosol y/o mitocondrias, espermatozoides
<b>Yodotironina deydinasas</b>		Regulación del tiroides	
Tipo 1 (ID1)	30	Producción T3	Tiroides, hígado, riñón
Tipo 2 (ID2)	30	Producción T3	Glándula tiroidea, glándula pituitaria, SNC, esqueleto, músculo cardíaco
Tipo 3 (ID3)	30	Degradación T3	Cerebro, piel, placenta
<b>Tiorredoxina reductasa</b>	11	Antioxidante, regulación procesos redox intracelulares y proliferación celular	Células cancerígenas, tejidos, piel, tiroides
<b>Selenofosfato sintetasa</b>	50	Síntesis de selenofosfato, precursor de SeCys	Bacterias
<b>Selenoproteína P</b>	57	Antioxidante, transporte, reserva de Se	Plasma sanguíneo de mamíferos, tiroides, hígado, corazón, pulmón
<b>Selenoproteína W</b>	15	Posible función redox y antioxidante involucrado en metabolismo cardíaco	Músculo, bazo, testículos, cerebro
<b>Selenoproteína-15 kDa</b>	15	Función redox	Próstata, tiroides
<b>Selenoproteína-34 kDa</b>	34	Movilidad espermatozoides	Espermatozoides (ratas)
<b>Selenoproteína-18 kDa</b>	18	Reserva	Riñón y otros tejidos

Veamos brevemente el papel biológico de algunas de las selenoproteínas más conocidas.

### Glutationas Peroxidasas

Fueron descubiertas en 1957 por Mills, aunque hasta 1973 no se demostró que el selenio era un componente esencial de las mismas<sup>54</sup>. Al ser las primeras selenoproteínas descritas, su estructura y función son las que están mejor definidas.

La principal función de esta familia de selenoproteínas es la protección de las células frente a la oxidación por parte de especies activadas de oxígeno como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Para ello las GPxs catalizan la reducción de peróxidos e hidroperóxidos que podrían causar daños a células y tejidos a través de la oxidación del glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG) (Figura 3).



**Figura 3.** Eliminación del peróxido de hidrógeno de las células y su transformación en H<sub>2</sub>O por la enzima glutatión peroxidasa.

La principal participación fisiológica de la GSH-Px es aportar una segunda línea de defensa contra los hidroperóxidos, manteniendo niveles adecuadamente bajos de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dentro de las células, reduciendo de esta forma el estrés oxidativo. Como consecuencia, el selenio, como parte de las glutatiónas peroxidasas, es considerado un agente antioxidante y tiene funciones independientes de la vitamina E, el hierro (como catalasa) y el zinc y el cobre (como superóxido dismutasa)<sup>55</sup>. Estos antioxidantes evitan la acción de los radicales libres, que pueden dañar el ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos en el organismo<sup>55,56</sup>.



Se han identificado 4 GPxs diferentes, cada una de las cuales contiene un residuo de selenocisteína por subunidad. Son estructural, cinética, inmunológica, electroforética y genéticamente diferentes y tienen funciones tanto individuales como comunes<sup>57</sup>, por lo que en caso de deficiencia de Se su regulación es diferente<sup>58</sup>. Éstas son:

La *forma GPx1* también denominada glutatona peroxidasa *celular, clásica o citosólica* es un homotetrámero de unos 88 kDa que está presente en el citosol de todas las células<sup>59</sup>, fundamentalmente en el hígado y en los eritrocitos. Es la proteína más abundante en mamíferos considerada como una de las principales proteínas antioxidantes<sup>60</sup>. La actividad de la glutatona peroxidasa celular ha sido durante mucho tiempo la única función bioquímica conocida del selenio, por lo que la medida de la actividad de esta enzima se ha empleado para evaluar el estatus nutricional de selenio de los individuos. Estados deficientes de selenio originan importantes pérdidas en su actividad, mayores que las que se producen en otras selenoproteínas, y su recuperación es más lenta tras la administración de complementos nutricionales en animales en estado de carencia. Por ello, se piensa que esta enzima podría tener una doble función, como antioxidante y como reserva de selenio<sup>61,62,63</sup>. También parece estar asociada a las propiedades anticancerígenas del selenio, dado que su expresión se ve alterada en las células malignas.

La *GPx2* o *glutatona peroxidasa gastrointestinal* es un tetrámero formado por subunidades idénticas de 22 kDa. De estudios con animales se concluye que su actividad principal se encuentra en el tracto gastrointestinal y juega un papel importante en la protección de los mamíferos frente a la toxicidad de hidroperóxidos lipídicos ingeridos<sup>64</sup>.



Los hidroperóxidos lipídicos son inestables en presencia de metales de transición que pueden descomponerlos y producir nuevos radicales libres y aldehídos citotóxicos<sup>65</sup>:



La forma *plasmática (GPx3)* difiere del resto en que es una glucoproteína de unos 88 kDa y la única de carácter extracelular. Fue purificada y caracterizada en el plasma humano, aunque también se ha encontrado en la leche materna<sup>66</sup> y parece que se sintetiza en las células del riñón<sup>67</sup>. Sus niveles de concentración en el plasma son extremadamente

bajos, por lo que sus propiedades antioxidantes son mucho menores que las de otros sustratos como la tioredoxina o la tioredoxina reductasa. Es la selenoproteína más abundante en el plasma después de la selenoproteína P.

Por último, la *GPx4* o *fosfolípido hidropoxidasa*, cuya función principal consiste en reducir los ácidos grasos hidropéroxidos que son esterificados a fosfolípidos<sup>68</sup>. También se ha demostrado que reduce los hidropéroxidos del colesterol y del éster del colesterol en membranas y lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>69,70</sup>. Es una de las selenoproteínas más abundantes en mamíferos. Está constituida por un monómero de unos 19 kDa, y puede encontrarse libre y soluble o enlazada en la membrana celular. Se localiza tanto en el núcleo como en el citosol y mitocondria<sup>60,71</sup>. En condiciones deficientes de selenio, la incorporación del analito a esta enzima es preferente frente a la GPx1. Se encuentra en elevadas concentraciones en los espermatozoides, y participa en la maduración del espermatozoide y en la prevención de la apoptosis celular. Se ha sugerido que puede ejercer una función en el sistema reproductivo masculino con un doble carácter: con una función estructural necesaria para la correcta movilidad del espermatozoide maduro y como antioxidante en los espermatozoides<sup>72,73</sup>.

### **Yodotironinas de yodinasas**

Se han identificado tres yodotironina de yodinasas diferentes (denominadas tipo 1, 2 y 3), codificadas por distintos genes y que muestran diferente especificidad, pero que están muy relacionadas entre sí. Estas selenoproteínas contienen selenocisteína en el sitio activo y son esenciales para la regulación del metabolismo de la hormona tiroidea. De ellas la tipo 1 (yodotironina 5'-de yodinasas) es probablemente la más importante.

Actúan produciendo y regulando el nivel de la forma activa de la hormona tiroidea 3,3',5'-triyodotironina (T3) a partir de tiroxina<sup>74</sup>. También catalizan la desyodonización de la tiroxina (T4) a triyodotironina, ésta última necesaria para el correcto metabolismo de la hormona tiroidea, de ahí las funciones endocrinas del selenio y su papel en el correcto crecimiento y desarrollo<sup>72,75,76,77</sup>.

La yodotironina de yodinasas tipo 1 (ID1) fue la primera en ser caracterizada como una selenoenzima. Se trata de un dímero con dos subunidades idénticas cada una de las cuales contiene un residuo de selenocisteína. Fue la primera selenoproteína en la que se observó la secuencia de inserción de la SeCys mediante el triplete UGA. Se encuentra fundamentalmente en la tiroides y en tejidos periféricos como hígado y riñones<sup>58,75</sup>. La forma ID2 presenta un peso molecular de unos 30 kDa y se expresa en la glándula pituitaria, sistema nervioso central, placenta y tejido adiposo de humanos y ratas, así como en la glándula tiroidea, esqueleto y músculo cardíaco de humanos, pero no de ratas. Su función fisiológica principal es la producción de T3 local (intracelular). Finalmente la

yodotironina de yodinasas tipo 3 (ID3) se encuentra en cerebro, piel y placenta, y es la responsable de la degradación de la forma activa de la hormona tiroidea para formar distintas especies inactivas.

### **Tiorredoxina reductasa**

Selenoenzima que actúa como antioxidante y se encuentra en todos los tejidos. Es responsable de la degradación de peróxidos e hidroperóxidos fuera de las membranas celulares. También recicla el ácido lipoico y la vitamina C, regula el metabolismo de la vitamina K3, el crecimiento celular y la actividad de la proteína p53 supresora de tumores<sup>78</sup>. Junto con la tiorredoxina, la tiorredoxina reductasa constituye un sistema eficaz de reducción de disulfuros proteicos<sup>79</sup>. Además, es responsable del incremento de los niveles de selenio en la célula. La adición de selenio a los humanos mediante suplementos incrementa su actividad antioxidativa 40 veces en células epiteliales<sup>80</sup>.

Está formada por dos unidades idénticas de 5.5 kDa, donde la SeCys constituye el penúltimo residuo antes del extremo C-terminal, a diferencia de la mayoría de las selenoproteínas que contienen este selenoaminoácido en el extremo N-terminal.

La tiorredoxina reductasa es una enzima que controla y reduce la expresión de tiorredoxina, cuyo aumento ha sido observado en diversos tumores humanos. Estudios recientes demuestran que bajos niveles de selenio disminuyen la actividad de la enzima y pueden estar relacionados con la habilidad de la célula para sufrir apoptosis, lo que incrementa el riesgo de padecer cáncer.

### **Selenofosfato sintetasa**

Es una de las enzimas necesarias para la incorporación de la selenocisteína en las selenoproteínas. En humanos se han identificado dos formas de esta enzima: Sp1<sup>81</sup> y Sp2<sup>82</sup> sin embargo, sólo la Sp2 es una selenoproteína. Su función específica es catalizar la producción de selenofosfato, un donante de selenio en las reacciones biológicas<sup>55,83</sup>.

### **Selenoproteína P**

Polipéptido glicosilado de unos 57 kDa, mayoritario en el plasma sanguíneo de los mamíferos. Contiene aproximadamente la mitad del selenio total presente en el plasma y es la única selenoproteína caracterizada que contiene múltiples residuos SeCys<sup>84,85</sup>. En estados carenciales de selenio, su síntesis parece ser preferente frente a la de las glutatiónas peroxidadas<sup>58,86</sup>.

Su función biológica no es muy clara, aunque originalmente se pensó que tenía una función de transporte, distribuyendo el Se a los diferentes órganos. Aunque no se admite de forma generalizada, el alto número de residuos de selenocisteína por molécula y su facilidad para degradarse han hecho pensar en un posible papel como forma de transporte de dicho aminoácido a través del organismo para utilizarlo en la síntesis de otras proteínas<sup>87</sup>. También se ha asumido que actúa como antioxidante extracelular contribuyendo a la descomposición del peroxinitrito, acción que comparte con otras selenoproteínas. Esta función antioxidante la llevaría a cabo principalmente en el sistema vascular y además podría proteger de la oxidación a las membranas celulares<sup>88</sup>. Se sintetiza principalmente en hígado, corazón y pulmones, desde donde se libera al aparato circulatorio.

Por otro lado, es capaz de unirse a metales pesados debido a que posee gran número de residuos de histidina y cisteína. En este sentido, varios trabajos han relacionado a la selenoproteína P con la capacidad del selenio para disminuir la toxicidad de los metales pesados<sup>89</sup>, concretamente mercurio, plata, cadmio, plomo, platino, estaño y talio<sup>90</sup>. El mecanismo de acción sugerido<sup>91,92,93,94,95</sup> implica la formación de complejos metal-selenio que se unen posteriormente a la selenoproteína P originando complejos ternarios del tipo [(Se-metal)<sub>n</sub>]<sub>m</sub>-Selenoproteína P.

### **Selenoproteína W**

Se trata de una selenoproteína de bajo peso molecular (15 kDa) que contiene un solo residuo de selenocisteína en un centro redox activo en el extremo N-terminal y se encuentra principalmente en los músculos, aunque también en el bazo, los testículos y el cerebro. Su función se ha asociado con la enfermedad del músculo blanco, un desorden metabólico caracterizado por la calcificación de los músculos esqueléticos, que remite cuando se lleva a cabo una suplementación con selenio. Asimismo, se ha especulado con la posibilidad de que la selenoproteína W esté involucrada en el metabolismo cardíaco y muscular, sin descartar un posible efecto antioxidante<sup>96</sup>.

### **Selenoproteína de 15 kDa**

Proteína que contiene un único residuo de SeCys en la mitad de la cadena peptídica Cys-Gly-SeCys-Lys. No presenta analogías en la secuencia con ninguna de las anteriores y su función, aunque desconocida, parece estar relacionada con una protección anticancerígena en las células secretoras. Se ha detectado en una gran variedad de tejidos, fundamentalmente en la próstata y el tiroides de humanos, ratones y ratas<sup>72,75,76</sup>.

### **Selenoproteína en la cápsula mitocondrial de los espermatozoides**

Selenoproteína de unos 34 kDa identificada en 1978 por Calvin en los espermatozoides de ratas, y que no ha sido encontrada en ningún otro tejido, aunque en la actualidad existe cierta controversia sobre si se trata de una única selenoproteína o es una variedad de la *GPx4*<sup>97,98</sup>. Algunos estudios indican que la síntesis de esta proteína se inhibe cuando existe deficiencia de selenio, produciéndose esterilidad por disminución en la movilidad de los espermatozoides, lugar donde se encuentran los niveles de concentración más altos de selenio en los tejidos de mamíferos<sup>55,75</sup>.

### **Selenoproteína mitocondrial de 18 kDa**

Localizada en las membranas mitocondriales de numerosos tejidos como el riñón, el hígado y el cerebro. Aunque su función no ha sido elucidada, se ha comprobado que, en estados carenciales de selenio, se sintetiza de forma preferente, fundamentalmente en los órganos con función endocrina, lo que podría estar relacionado con su importancia biológica.

## **2.2. EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE SELENIO**

La deficiencia de selenio afecta a distintos tipos de tejidos en diferentes vías como consecuencia de la existencia de distintas selenoproteínas. La biosíntesis de selenoproteínas depende de la disponibilidad de selenio. Como consecuencia, las selenoproteínas con una función biológica poco relevante responden más rápidamente a la deficiencia de selenio, perdiendo su actividad, mientras que las selenoproteínas con una función biológica de mayor importancia permanecen estables en estados carenciales de tipo moderado, y sólo disminuyen su actividad cuando la deficiencia es sustancial y prolongada<sup>52,99</sup>. Estas proteínas se recuperan rápidamente tras la ingesta de complementos nutricionales con selenio<sup>100</sup>. En general, el aporte de selenio al cerebro y a los órganos de los sistemas endocrino y reproductor se mantiene, en la medida de lo posible, en los niveles óptimos. Por su parte, el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y los glóbulos rojos son los menos prioritarios para el elemento, lo cual explica que estos sean los tejidos en los que primero aparecen lesiones cuando el aporte de selenio no es el adecuado<sup>101,102</sup>.

El reconocimiento del importante papel de las selenoproteínas en el metabolismo ayuda a explicar las consecuencias adversas de la deficiencia del selenio en la salud de los animales y humanos.

En animales, los desórdenes asociados con la deficiencia en selenio han sido identificados principalmente en zonas cuyos suelos presentan bajo contenido en el elemento. Así, desde 1950 se han identificado enfermedades que afectan a la reproducción y el crecimiento, así como la llamada enfermedad del músculo blanco. En pollos y aves de corral, los estados carenciales de selenio están asociados a una disminución en la producción de huevos, problemas de fertilidad y aumento de la mortalidad embrionaria.

El descubrimiento de desórdenes clínicos asociados a la falta de selenio como la enfermedad de Keshan en China y la aparición de miopatías y cardiomiopatías en pacientes con alimentación parenteral han puesto de manifiesto la importancia del selenio en estados carenciales<sup>103</sup>. Por otro lado, existen evidencias de que la deficiencia de selenio puede aumentar la susceptibilidad a ciertas enfermedades y dificultar así el mantenimiento de un estado de salud óptimo. Niveles bajos del elemento pueden contribuir en algunos casos a las causas de la enfermedad, pero en otros pueden ser una consecuencia de la propia enfermedad capaz de agravar su progresión.

A continuación se recogen y comentan brevemente algunos de los desórdenes y enfermedades en humanos asociados con la deficiencia de selenio en la dieta.

En el hombre, la aparición de enfermedades debidas a la deficiencia de selenio se produce por ingesta de cantidades inferiores a  $50 \mu\text{g día}^{-1}$ <sup>104</sup>. La primera observación se hizo en la provincia de Keshan en China y desde entonces se observó en otras zonas incluyendo Nueva Zelanda y Finlandia en donde las concentraciones de Se en el suelo son también bajas. Se caracteriza por unos niveles de selenio extremadamente bajos, y ha podido ser controlada mediante la suplementación con selenio. Sin embargo, a pesar de la suplementación, se dan casos crónicos que sugieren que la falta de selenio predispone a la enfermedad pero no es su causa primaria, que podría tener relación con infecciones virales<sup>52,53</sup>.

También se ha asociado a deficiencias de selenio la enfermedad de Kashin-Beck, que es una osteoartropatía caracterizada por atrofia, degeneración y necrosis de los cartílagos que afecta primordialmente a niños entre 5-13 años. Fue descrita por primera vez en Siberia aunque también se han presentado casos en China<sup>105</sup>. La causa de esta enfermedad no está clara, aunque la deficiencia de selenio y de yodo, la contaminación de la comida con hongos y la presencia de elevados contenidos orgánicos (p.e. ácido fúlvico) en el agua han sido propuestos como factores que contribuyen a la aparición de la enfermedad<sup>19,53</sup>.

Por otro lado, la deficiencia de selenio podría crear un ambiente susceptible para reducir la resistencia del individuo a otro tipo de fatigas como infecciones virales o microtoxinas. Numerosos estudios apuntan que la deficiencia de selenio está acompañada por la pérdida de inmunocompetencia que probablemente esté relacionada con el hecho de que el selenio se encuentra normalmente en tejidos del sistema inmune como hígado, bazo y nódulos linfáticos. En este sentido, las células del sistema inmunológico podrían tener una importante necesidad funcional de selenio. De hecho, la suplementación con selenio, incluso cuando no hay deficiencia, produce efectos estimulantes del sistema inmune. Los dispositivos celulares de defensa frente a una infección implican a las enzimas antioxidantes, entre ellas las GPxs y probablemente la Selenoproteína P. Como la biosíntesis de estas selenoproteínas no es prioritaria en caso de deficiencia de selenio, el deterioro de la defensa antioxidante es uno de los primeros síntomas de dicha deficiencia. Por ello no sorprende que la deficiencia de selenio esté asociada con la aparición, virulencia y progresión de ciertas infecciones víricas. Por otra parte, los virus podrían ser capaces de secuestrar el selenio del individuo para incorporarlo a las selenoproteínas del propio virus, mermando la capacidad de respuesta inmune del enfermo. El selenio parece ser un nutriente crucial para individuos afectados por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana) y es un potente inhibidor de la replicación del virus *in vitro*. En los primeros estadios de la enfermedad, aparece una disminución de los niveles de selenio. Además, el nivel de selenio en plasma permite predecir las consecuencias de la infección por VIH. Así, los pacientes de VIH con deficiencia de selenio tienen 20 veces más posibilidades de morir por causas relacionadas con el virus que los pacientes con un nivel adecuado de selenio<sup>53,55,76</sup>. El selenio también parece proteger a individuos afectados por el virus de la hepatitis B o C contra la progresión de la enfermedad a cáncer de hígado.

El selenio juega un papel esencial en la reproducción animal. De hecho, la deficiencia del mismo está relacionada con la aparición de abortos. Algunos estudios realizados en humanos han encontrado niveles de selenio significativamente bajos en el suero sanguíneo de mujeres que han sufrido abortos durante el primer trimestre o de forma recurrente<sup>106</sup>. Los abortos podrían estar relacionados con una protección insuficiente de las membranas biológicas y del ADN frente a la oxidación, debido a los bajos niveles de GPx. Además, el selenio es esencial en la fertilidad masculina, siendo necesario para la biosíntesis de la testosterona y para la formación y desarrollo normal de los espermatozoides. Se ha encontrado que una deficiencia de selenio se traduciría en una disminución de la cantidad de phGPx, afectando a la fertilidad.

Existen numerosas evidencias de que el selenio es muy importante para el funcionamiento adecuado de otros órganos, como el cerebro o el corazón. En estados carenciales, el cerebro recibe un suministro prioritario. El estrés oxidativo y generación de especies reactivas de oxígeno están fuertemente implicadas en algunas enfermedades

neuronales y neuromusculares como la apoplejía, Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y distrofia muscular. Por ello el selenio, gracias a su efecto antioxidante, podría proteger al organismo frente a dichas enfermedades<sup>107</sup>. Por otro lado, y a pesar de que bajos niveles de selenio en sangre se han asociado con la incidencia de infarto de miocardio y con tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares elevadas<sup>55,108</sup>, el papel del selenio no ha sido establecido con claridad.

Otros efectos beneficiosos del selenio están relacionados con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, actuando frente a la pancreatitis y mejorando los síntomas de ciertas enfermedades, como el asma o la artritis reumatoide.

Por último, estudios epidemiológicos, experimentos con animales y ensayos clínicos llevados a cabo en los últimos años han demostrado la existencia de una correlación importante entre los niveles de selenio y la incidencia de algunos tipos de cáncer. Este descubrimiento ha contribuido enormemente a que se hayan multiplicado las investigaciones en torno al papel de este elemento. Aproximadamente una tercera parte de las afecciones cancerígenas desarrolladas en humanos tienen un origen medioambiental, observándose una disminución de un 50% en su incidencia, en dietas ricas en selenio<sup>109</sup>. Por otro lado, estudios experimentales realizados en animales indican que exposiciones supranutricionales de selenio pueden reducir significativamente las proliferaciones tumorales.

El efecto anticancerígeno dependerá de la dosis y de la forma química del selenio<sup>110</sup>. Entre las especies naturales de selenio, las capaces de producir fácilmente especies monometiladas han demostrado ser especialmente activas<sup>53,111,112</sup>. El monometilselenol es considerado como un metabolito crítico para la protección de ciertos cánceres. Además, algunos compuestos sintéticos de selenio, que no son utilizados en la síntesis de selenoproteínas, también muestran efectos anticancerígenos<sup>53,60,111</sup>. En este grupo destacan algunos compuestos aromáticos de selenio que presentan menor toxicidad, reduciendo los posibles efectos secundarios, y mayor potencial quimiopreventivo del cáncer que los naturales<sup>113,114</sup>.

El selenio es capaz de inhibir cánceres inducidos tanto por virus como químicamente y no sólo se inhibe la iniciación de la enfermedad sino también su desarrollo. Además, el efecto del selenio parece ser reversible<sup>115</sup>. En este sentido, se han propuesto cinco posibles mecanismos por los que el elemento podría desarrollar su papel de agente protector frente al cáncer<sup>115,116</sup>.

➤ A través del efecto antioxidante de las selenoproteínas, que puede proteger a los organismos frente al cáncer (puesto que los peróxidos y las especies activas de oxígeno provocan daño genético y posiblemente cáncer). Gracias a las propiedades antioxidantes de las glutatiónas peroxidadasas se puede eliminar el ADN dañado por



peróxidos y regular el sistema redox, crítico en el crecimiento de algunos cánceres, como el de piel por incidencia de la radiación ultravioleta<sup>117</sup>. Sin embargo, el papel quimiopreventivo del selenio requiere un aporte supranutricional del elemento, que no eleva los niveles de las selenoproteínas antioxidantes en los tejidos por encima de los que se dan cuando el nivel de selenio es adecuado, con la excepción de la tiorredoxina reductasa<sup>118</sup>.

➤ Por el estímulo del sistema inmunitario que se produce como respuesta a niveles supranutricionales de selenio. Sin embargo, no existen suficientes evidencia para considerar que el mecanismo por el que el selenio detiene el avance de los tumores esté claramente relacionado con este efecto.

➤ Debido al efecto del selenio en el metabolismo de los agentes cancerígenos. Así el selenio podría prevenir el cáncer reaccionando con los agentes cancerígenos para evitar que éstos se unan al ADN originando mutaciones.

➤ A través de efectos sobre el ciclo celular. En cultivos celulares, ciertos compuestos de selenio afectan de forma significativa a la viabilidad de las células, al ciclo celular, a la síntesis de proteínas y a la integridad del ADN<sup>111,119</sup>. Por ello, algunos autores consideran que el selenio podría proteger al organismo frente a procesos cancerosos ya iniciados interfiriendo en el ciclo de células tumorales. Aunque los mecanismos moleculares por los que el selenio produce paradas del ciclo celular y apoptosis son desconocidos, se sabe que su actividad está relacionada con la selenoproteína P (que se expresa en la próstata) y con la selenoproteína de 15 kDa, que se encuentra en niveles muy bajos en enfermos afectados por cáncer de próstata<sup>120</sup>.

➤ Por inhibición de la proliferación celular. El hecho de que el selenio actúe como anticancerígeno a dosis superiores a las requeridas para que la actividad de las selenoproteínas sea máxima, da pie a pensar que ciertos metabolitos del elemento puedan inhibir el crecimiento de las células tumorales. Este es el caso de las yodotironinas de yodinasas, al ser reguladoras del metabolismo de la hormona tiroidea y, por tanto, afectar al crecimiento de células malignas.

Sin embargo, sólo se ha demostrado el papel anticarcinogénico del selenio en determinadas dosis, empleándose como complemento en dietas de pacientes afectados por determinados tumores (próstata, pulmón, estómago, colon, hígado,..).

### 2.3. EFECTOS DEL EXCESO DE SELENIO: TOXICIDAD DEL ELEMENTO

Además de los posibles efectos beneficiosos anteriormente mencionados, el selenio puede llegar a provocar efectos tóxicos cuando se adquiere en concentraciones superiores a  $200 \mu\text{g día}^{-1}$ <sup>104</sup>. Sus efectos tóxicos se conocen desde hace mucho tiempo. Ya en el siglo XIII, Marco Polo descubrió plantas seleníferas en una región montañosa de China cuya ingesta causaba la pérdida de las pezuñas en los animales.

La toxicidad del selenio depende de factores tales como la forma química, la especie biológica, la concentración y las posibles transformaciones que puede sufrir en su interacción con el medio.

Las especies orgánicas de los elementos suelen considerarse más tóxicas que las especies inorgánicas, por su naturaleza lipofílica, al poseer mayor facilidad para difundir rápidamente a través de las membranas celulares. Sin embargo, muchas especies orgánicas de selenio, como es el caso de los selenoaminoácidos, son esenciales y forman parte de las proteínas, por lo que su toxicidad potencial se reduce. Las especies metiladas de selenio, salvo el trimetilselenonio ( $\text{TMSe}^+$ ), son volátiles y tóxicas a niveles de concentración elevados. Las especies monometiladas son generalmente bien toleradas, debido a que pueden transformarse fácilmente a  $\text{DMSe}$  y  $\text{TMSe}^+$ , con menor actividad biológica y fácil excreción del organismo<sup>9,121</sup>. Dentro de las formas inorgánicas, el selenio elemental parece ser el menos tóxico por ser el más insoluble y por tanto difícilmente asimilable por los organismos. La especie selenito es más tóxica que el seleniato, pero a ambas se les otorgan propiedades mutagénicas<sup>30,122</sup>.

El hombre se ha mostrado menos sensible que los animales a sobredosis de selenio. Se desconocen los niveles precisos en la dieta para producir intoxicación crónica, pero cantidades del orden de  $2\text{-}8 \text{ mg kg}^{-1}$  son capaces de producir graves lesiones. Se han dado casos de selenosis crónica en zonas geográficas extremadamente ricas en selenio (zonas de China y Venezuela)<sup>123</sup>. Entre los años 1961 y 1964 se detectó en Enshi (China) en la población humana una enfermedad endémica manifestada por pérdida de cabello, uñas, irritación de la piel y los ojos, y debilidad de los dientes. Otros síntomas de toxicidad son anorexia, dolor abdominal, diarrea, fatiga, irritabilidad, depresión, edema pulmonar, hemorragias, necrosis de hígado y riñón, mal aliento, deterioro neurológico, ceguera y caries dental. Este mal se atribuyó a un alto contenido de selenio en el maíz.

Sin embargo, la población con más riesgo de sufrir selenosis está constituida por personas que trabajan en la industria del selenio. De hecho, existen casos de envenenamiento por exposición industrial de especies de selenio volátiles como  $\text{SeO}_2$ ,  $\text{SeOCl}_2$  y  $\text{SeH}_2$ <sup>124</sup>.

Otro aspecto relacionado con la toxicidad del selenio es la selenofilia, nombre con el que se conoce la intoxicación por selenio derivada de la utilización abusiva de

suplementos de dicho elemento para prevenir, aliviar o curar diversas patologías que no muestran relación directa con el selenio nutricional. La automedicación en este caso no es inocua y existe riesgo de intoxicación debido al estrecho rango de esencialidad del elemento. En Estados Unidos se han dado numerosos casos de intoxicación por esta práctica<sup>125,126</sup>.

## 2.4. METABOLISMO DEL SELENIO EN ANIMALES SUPERIORES

El metabolismo del selenio en animales superiores está encaminado principalmente a la síntesis de selenoproteínas, que incorporan residuos de selenocisteína en su sitio activo, de tal forma que la presencia del elemento es indispensable para realizar su función catalítica. La mayoría de las formas en que se encuentra el selenio en la dieta (formas inorgánicas y orgánicas) se biotransforman siguiendo las principales rutas metabólicas que se muestran en la figura 4.

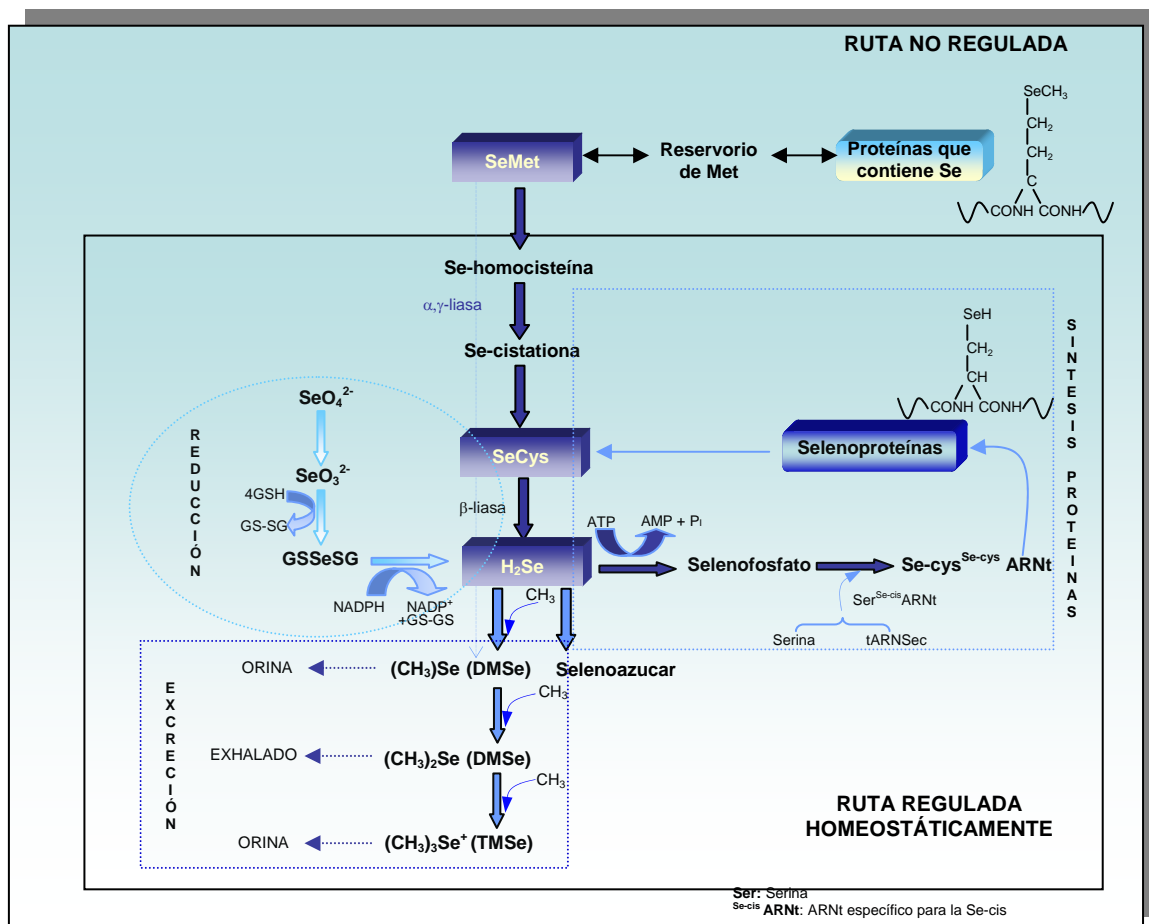


Figura 4. Esquema de la ruta metabólica del selenio en animales superiores

Varios estudios indican que los compuestos de selenio se metabolizan mediante dos vías principales: reducción seguida de metilación (excreción) o incorporación directa a

las proteínas (asimilación). Así, el selenito y el seleniato inorgánico ingeridos son transformados a seleniuro de hidrógeno en los glóbulos rojos y el hígado respectivamente<sup>127</sup> tras un mecanismo reductivo que implica la formación de intermedios (selenodiglutatona selenotrisulfuro, GSSeSG) con la glutatona peroxidasa. Sin embargo, la selenometionina se convierte en selenocisteína (formando como intermediarios Se-homocisteína y Se-cistationina sucesivamente por una ruta que no requiere enzimas específicas para el selenio sino que son comunes para selenio y azufre<sup>152</sup> y ésta se transforma finalmente en seleniuro por efecto de la  $\beta$ -liasa<sup>128</sup>.

Como puede verse, la ruta metabólica seguida por el selenio en animales tiene como intermediario al seleniuro ( $\text{Se}^{2-}$ ) independientemente de la forma en la que el elemento es suministrado. El seleniuro de hidrógeno (ionizado como  $\text{HSe}^-$  a pH fisiológico) se considera un compuesto intermedio en la síntesis de selenocisteína en proteínas, así como en la síntesis de productos de detoxificación<sup>129,130</sup>, puesto que puede activarse a selenofosfato, con la consiguiente incorporación a las selenoproteínas, o ser eliminado a través de compuestos metilados<sup>131</sup>.

A partir del seleniuro se forma selenofosfato a través de un proceso catalizado por la enzima selenofosfato sintetasa en el que el nucleótido ATP (adenosin trifosfato) es el responsable de la fosforilación. El selenio es transferido desde el selenofosfato a una molécula de ARN de transferencia específica para la selenocisteína ( $^{\text{Se-cis}}\text{ARNt}$ ) que contiene serina (Ser), la cual es convertida en selenocisteína por acción de la enzima selenocisteína sintetasa, obteniéndose dicho selenocompuesto unido al ARNt ( $\text{Se-cis}^{\text{Se-cis}}\text{ARNt}$ ). El ARNt traslada la selenocisteína a los ribosomas para incorporarla a la cadena proteica través de su propio triplete de inserción (codón UGA). Dicha incorporación está determinada genéticamente, de manera que las proteínas resultantes necesitan el selenio para realizar su función. Es por ello que se denominan "selenoproteínas". Estas selenoproteínas son las responsables de la esencialidad del elemento para los animales y en ellas el selenio participa en reacciones redox, constituyendo el centro activo de las selenoenzimas. Se han encontrado evidencias de que los niveles de selenoproteínas en los tejidos están controlados de forma homeostática, ya que la administración de altas dosis de selenio no eleva dichos niveles por encima de los alcanzados con ingestas de selenio adecuadas.

El seleniuro, como se ha comentado anteriormente, no es sólo el punto de partida común para la formación de selenoproteínas, sino que la excreción del elemento también parte de él. El exceso de selenio ingerido así como el procedente de la utilización o degradación de las selenoproteínas es eliminado a través de la orina o del aliento en forma de seleniuros metilados, concretamente como selenio mono-, di-, o trimetilado. El metabolito principal en la orina ha sido identificado como un selenoazúcar<sup>132,128</sup> y su precursor ha sido encontrado en el hígado por Kobayashi y col., que han propuesto un

mecanismo de síntesis<sup>133</sup>. También la forma trimetilada, que corresponde al ión trimetilselenonio (TMS<sub>e</sub>), se elimina por la orina tras la exposición a dosis excesivas del elemento. Por lo que respecta al dimetilseleniuro (DMSe, la forma dimetilada), se elimina a través del aliento pero sólo tras dosis inusualmente elevadas de selenio. Estudios con animales han demostrado que la selenometionina se degrada directamente mediante la acción de  $\alpha,\gamma$ -liasas en el hígado a monometilselenonio, el cual es convertido posteriormente a TMSE<sup>134,135</sup>. Otras formas de eliminar el selenio son a través de las heces (como seleniuros metálicos y selenio elemental) o a través del pelo, como proteínas no específicas (con selenometionina) que una vez en el cabello quedan retenidas y no pueden ser metabolizadas<sup>136</sup>. Por lo que respecta a las heces, el selenio eliminado por esta vía suele corresponder a fracciones del elemento no absorbidas<sup>137</sup>.

Aparte de la ruta común para todas las especies de selenio, la selenometionina puede seguir otra ruta metabólica por la que es incorporada intacta a proteínas “comunes” de forma inespecífica en lugar de la metionina, pues el organismo no es capaz de diferenciar ambas moléculas. En estas proteínas el selenio no está implicado en la función biológica correspondiente, por lo que no se clasifican como selenoproteínas sino que se trata simplemente de proteínas que contienen selenio. La incorporación de la SeMet en lugar de la metionina es aleatoria, y esta sustitución no altera de forma significativa la estructura proteica. Sin embargo, pueden producirse cambios en la actividad enzimática cuando la sustitución se realiza en las proximidades del centro activo, ya que el grupo CH<sub>3</sub>-Se presente en la SeMet es más hidrofóbico que el correspondiente CH<sub>3</sub>-S de la metionina. A través de este mecanismo es posible almacenar selenio en el organismo que, si es necesario, puede ser reutilizado siguiendo los cauces metabólicos normales. Cuando la cantidad de metionina es baja, el porcentaje de selenometionina incorporada inespecíficamente aumenta de forma significativa. Por otro lado, esta incorporación de selenometionina a proteínas no está regulada por ningún mecanismo homeostático, por lo que sólo un exceso de selenio administrado como selenometionina puede elevar el contenido de selenio en el cuerpo por encima de los niveles adecuados (homeostáticos).

Las proteínas que contienen selenometionina se forman en órganos que presentan una elevada velocidad de síntesis de proteínas, como músculos esqueléticos, eritrocitos, páncreas, hígado, riñón, estómago, etc. A diferencia de lo que sucede en las plantas, es importante resaltar que los animales superiores no son capaces de sintetizar selenometionina.

### 3. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA Y SU BIODISPONIBILIDAD

#### 3.1. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA

Excepto en circunstancias poco frecuentes de exposición laboral o de ingesta accidental de reactivos, la única fuente significativa de aporte de selenio para el hombre es la dieta<sup>138</sup>, razón por la cual los conocimientos sobre su abundancia o carencia en los alimentos son de especial interés. La cantidad diaria recomendada (“Recomendación Dietary Allowance”, RDA) en EEUU está establecida en 70 y 55  $\mu\text{g}$  para hombres y mujeres respectivamente, pero hay que tener en cuenta que la contribución del selenio procedente de los distintos alimentos puede ser muy variable según el país y la concentración de este elemento en el suelo<sup>139</sup>.

El estado y la concentración del selenio en los alimentos de origen vegetal son altamente variables y dependen principalmente de las condiciones del suelo en el que se han cultivado<sup>140</sup> puesto que los vegetales incorporan el selenio absorbido del suelo en las proteínas, principalmente en forma de selenometionina o selenocisteína. Desde los años setenta se han venido realizando algunos estudios en los granos de cereales que han puesto de manifiesto que la forma química mayoritaria en la que se encuentra el selenio en el trigo, semillas de soja, arroz y maíz es la selenometionina<sup>141</sup>. Sin embargo, en los alimentos de origen animal el contenido de selenio no varía tanto como en los vegetales porque los animales pueden conservar el selenio en estados de bajo aporte, y excretar grandes cantidades en caso de suplementos excesivos<sup>142</sup>. En los animales el selenio, bajo la forma de selenocisteína, se encuentra en proteínas específicas, sobre todo en la GSH-Px, mientras que la selenometionina de origen alimentario sigue la ruta metabólica de la metionina y es incorporada en su lugar en las proteínas, constituyendo así una forma de reserva. Sí la selenometionina fuera necesaria para las células, sufriría una proteólisis fisiológica y se liberaría de forma retardada.

Las fuentes principales de selenio en la dieta humana son la carne, pescados y mariscos, en los que el selenio se encuentra unido a proteínas. Los riñones, seguidos del hígado, son los tejidos animales con mayor contenido en selenio. En general, de todos los alimentos adquiridos en la dieta, la ternera, el cerdo, el pollo y el pescado suponen, aproximadamente, el 36% del selenio total ingerido; mientras que el pan y los cereales el 22%<sup>55,76</sup>.

Las concentraciones aproximadas del selenio en los principales grupos de alimentos destinados al consumo humano se recogen en la siguiente Tabla:

**Tabla 7.** Contenido de selenio en los principales grupos de alimentos

<b>Alimento</b>	<b>µg Se en 100 g alimento</b>
Carnes (músculo)	10-40
Órganos (hígado, riñón)	40-150
Marisco	
Cereales y granos	10-80
Productos lácteos	10-30
Vegetales y frutas	<10

En España son la carne, el pescado, la leche y los cereales los alimentos que aportan la mayor parte de este mineral a la dieta<sup>143</sup>.

### 3.2. BIODISPONIBILIDAD DEL SELENIO

Para establecer el balance correcto de selenio, tanto en el hombre como en los animales, es necesario estimar la eficacia del aporte de este elemento traza a través de la dieta. Como ocurre en el resto de elementos traza, no basta con determinar el contenido total, sino que es preciso conocer su biodisponibilidad, cantidad que se absorbe y es utilizada por el organismo<sup>144</sup>, ya que en la mayoría de los alimentos sólo una parte es disponible. La biodisponibilidad del selenio depende, no sólo de su absorción en el intestino sino también de su conversión en una forma biológicamente activa<sup>145</sup>. Por ello, Foster y Sumar<sup>146</sup> la definen como la porción de selenio ingerido que después de ser absorbido es incorporado en una forma biológicamente activa.

El selenio es un ejemplo de nutriente esencial consumido en diferentes formas químicas, por lo que es necesario conocer tanto la biodisponibilidad como el metabolismo de estas formas para: establecer las ingestas dietéticas y tóxicas permisibles<sup>147</sup>, evaluar la adecuación de la dieta a las recomendaciones (RDR), y seleccionar los compuestos más eficaces para la absorción del selenio y así poder establecer recomendaciones para la restauración, suplementación o enriquecimiento de los alimentos o productos dietéticos<sup>148</sup>.

En general las formas orgánicas del selenio son más biodisponibles que las inorgánicas<sup>149</sup>; la selenometionina (forma orgánica predominante del selenio en la dieta) se absorbe bien, con un intervalo comprendido entre el 76 y el 100%, mientras que dentro de las formas inorgánicas del selenio (que representan sólo una pequeña fracción del total en el alimento y suelen emplearse como suplementos nutricionales), el seleniato se absorbe más eficientemente (>90%) que el selenito (>60%)<sup>150</sup>, aunque una fracción significativa se

excreta en la orina antes de que pueda ser incorporado en los tejidos y el selenito se retiene mejor. Se estima que la selenometionina ingerida se absorbe en el intestino delgado mediante mecanismos similares a los de la metionina. La SeMet que no es inmediatamente metabolizada se incorpora a las proteínas de órganos tales como músculos del esqueleto (47% del Se total)<sup>151</sup>, eritrocitos, páncreas, hígado, riñón, estómago y mucosa gastrointestinal. También se ha detectado en el cerebro y en el plasma, generalmente unida a la albúmina<sup>152</sup>.

Las diferencias encontradas entre las tres especies son debidas a que el aminoácido sigue rutas metabólicas similares a las de su homólogo con azufre y se incorpora en los tejidos del cuerpo de forma no específica e irregular, mientras que los compuestos inorgánicos siguen un proceso con regulación homeostática. El selenio inorgánico es rápidamente absorbido, pero, igualmente, es rápidamente excretado, mientras que la SeMet queda retenida en el cuerpo<sup>153</sup>. La vida media de la seleniomietionina y el selenito en humanos se ha estimado en 252 y 102 días respectivamente, lo que indica que la selenometionina es utilizada y reutilizada extensamente<sup>154,155</sup>.

Existen distintas formas de medir la biodisponibilidad del selenio en alimentos. La mayoría de los autores consideran el incremento provocado en la actividad de las GPxs en diferentes tejidos<sup>156,157,158,159</sup>, aunque también se utilizan las concentraciones del elemento en plasma, hígado y otros tejidos, así como la actividad de otras selenoenzimas<sup>160</sup> para establecer dicha disponibilidad.

Debido a que el selenio puede encontrarse en diferentes formas químicas en los alimentos, no debe sorprendernos la considerable variación en su biodisponibilidad según el tipo de alimento. En los cereales, la levadura de cerveza y en la mayor parte de los productos vegetales la disponibilidad del selenio es muy elevada, entre el 85 y el 100%, mientras que en el pescado se encuentra entre el 20 y el 50%<sup>161</sup>. En el caso de la carne y los productos cárnicos la biodisponibilidad se halla en torno al 15%.

Con respecto a los derivados lácteos, un estudio de Shen<sup>162</sup> ha puesto de manifiesto que la biodisponibilidad de la leche materna es significativamente superior a la de las leches de vaca, cabra y oveja. Se supone que las diferencias se deben principalmente a las diferencias en la composición proteica y la forma química del selenio.

Los estudios de la bioaccesibilidad *in vitro* de un determinado elemento pretenden calcular, mediante la simulación de una digestión gastrointestinal, el porcentaje del nutriente que puede ser transformado en el intestino en una forma absorbible<sup>163</sup>, constituyendo así un método sencillo, rápido y barato. Los resultados obtenidos en distintas investigaciones han mostrado distinta solubilidad para el selenio tras las digestiones gástrica e intestinal en función del alimento: mejillón (84%)<sup>164</sup>, gamba (70%)<sup>165</sup>, bacalao (61%)<sup>166</sup> y ostras (90%)<sup>167</sup>.



Por lo tanto, la absorción y biodisponibilidad del selenio en los alimentos estarán determinadas por la forma química, la absorción intestinal y la composición de la dieta. Otro factor que también podría afectar al contenido y la biodisponibilidad de este animal sería el tratamiento de los alimentos, por lo que la medida de los niveles de este elemento presente en un alimento antes de su procesado, cocinado y empaquetado no sería reflejo de la cantidad real consumida por el hombre<sup>168</sup>. El proceso de molienda de trigo para la obtención de harina, y el calentamiento y molienda de cereales durante su producción supone pérdidas importantes de este elemento. Sin embargo, las prácticas culinarias más usuales (cocción, asado, desecación, etc) no producen cambios en el contenido de selenio en los alimentos<sup>169</sup>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Cutter G.A., *Anal. Chem.*, 1985, 57, 2951.
- <sup>2</sup> Thomson-Eagle E.T., Frankenberger W.T., Karlson V., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55, 1406.
- <sup>3</sup> Amouroux D., Donard O.F.X., *Marine Chem.*, 1997, 58, 173.
- <sup>4</sup> NAS, *Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants: Selenium*, 1976, National Academy of Sciences, Washington, EEUU.
- <sup>5</sup> Bennett B.G., *Sci. Total Environ.*, 1983, 31, 117.
- <sup>6</sup> Hashimoto Y., Hurang J.Y., Yanagisawa S., *Environ. Sci. Technol.*, 1970, 4, 157.
- <sup>7</sup> Jenkins R.A., *Environmental Carcinogenesis, Selected Methods of Analysis*, 1985. O'Neill I.K., Schuller P., Fishbein L. (Eds). International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia.
- <sup>8</sup> Germani M.S., Zoller W.H., *Environ. Sci. Technol.*, 1988, 22, 1079.
- <sup>9</sup> Fishbein L., *Metals and their compounds in the environment: Selenium*, 1991, pp 1153-1191. Fishbein L. (Ed). Washington, EEUU.
- <sup>10</sup> Knight A.W., Maier K.J., Foe C., Ogle R.S., Williams M.J., Kiffney P., Melton L.A., *Trace Subst. Environ. Health*, 1987, 21, 361.
- <sup>11</sup> Merian E, *Carcinogenic and Mutagenic Compounds*, 1985, pp.25-32. Merian E., Frei R.W., Härdi W., Scjhlatler C. (Eds). Gordon & Breach, Londres, Inglaterra.
- <sup>12</sup> Raptis S.E., Kaiser G., Tölg G., *Fresenius Z. Anal. Chem*, 1983, 316, 105.
- <sup>13</sup> Camps Aberstain M., *Edafología*, 2001, 8, 31.
- <sup>14</sup> Herbel M.J., Johnson T.M., Tanji K.K., Gao S., Bullen T.D., *J. Environ. Qual.*, 2002, 31(4), 1146.
- <sup>15</sup> Robberecht H., *Trace Substances in Environmental Health*, 1980, Van Grieken R., Hemphill D.D. (Eds). University of Missouri, Columbia, EEUU.
- <sup>16</sup> Ross H.B., NATO ASI series, 1990, G-23, 523.
- <sup>17</sup> Haygarth P.M., Jones K.C., Harrison A.F., *Sci. Total Environ.*, 1991, 103, 89.
- <sup>18</sup> Combs G.F., Combs S.B., *The role of selenium in nutrition*, 1986, pp 19. Jovanovich H.B. (Ed). Academic Press Inc.
- <sup>19</sup> Barceloux D.G., *Clin. Toxicol.*, 1999, 37, 145.
- <sup>20</sup> Wilber C.G., *Chem. Toxicol.*, 1980, 17, 171.
- <sup>21</sup> Fox P.M., LeDuc D.L., Hussein H., Lin Z., Terry N., *ACS Symp. Ser.*, 2003, 835.
- <sup>22</sup> Séby F., Potin-Gautier M., Léspe G., Astruc M., *Sci. Total Environ.*, 1997, 207, 81.
- <sup>23</sup> Dungan R.S., Frankenberger W.T., *Biorem J.*, 1999, 3, 171.
- <sup>24</sup> Mayland H.F., *Selenium in the Environment*, 1994, pp 29-45. Frankenberger W.T., Benson Jr., Benson S. (Eds). Marcel-Dekker Inc., Nueva York.
- <sup>25</sup> Presser T.S., *Selenium in the Environment*, 1994, pp 139-156. Frankenberger W.T., Benson Jr., Benson S. (Eds). Marcel-Dekker Inc., Nueva York.

- <sup>26</sup> Conde J.E., Sanz Alaejos M., *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1979.
- <sup>27</sup> Fan T., Cutter G., *Report on the Peer Consultation Workshop on Selenium Aquatic Toxicity and Bioaccumulation*, 1998. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington, EEUU.
- <sup>28</sup> Glover J., Levander O., Parizek J., Vouk V., *Handbook on Toxicology of Metals*, 1979, pp.555-577. Fridberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. (Eds). Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam, Holanda.
- <sup>29</sup> Newland N.W., *The handbook of environmental chemistry 3, Part B, Anthropogenic Compounds*, 1982, pp. 45-57. Hutzinger O. (Ed). Springer, Verlag, Heidelberg.
- <sup>30</sup> Einbrodt H.J., Michels S., *Metalle in der Umwelt*, 1984, pp. 541-554. Merian E. (Ed). Verelag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach/Florida-Basel.
- <sup>31</sup> Bruland, K.W., *Chemical oceanography: Trace elements in seawater*, 1983, pp 157-220. Riley J.P., Chester R. (Eds). Academic Press London, Londres.
- <sup>32</sup> Dhillon K.S., Dhillon S.K., *Hydrol J.*, 2003, 272, 120.
- <sup>33</sup> Olson O.E., Palmer I.S., *Metabolism*, 1976, 25, 299.
- <sup>34</sup> Surai P.F., *World's Poultry Sci. J.*, 2002, 58, 333.
- <sup>35</sup> Brown T.C., Shrift A., *Biol. Rev.*, 1982, 57, 59.
- <sup>36</sup> Wu L., *Selenium in the Environment*, 1994, pp 279-342. Frankenberger W.T., Benson J., Benson S. (Eds). Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- <sup>37</sup> Läuchli A., *Bot. Acta*, 1993, 106, 455.
- <sup>38</sup> Dauchy X., Potin-Gutier M., Astruc M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, 348, 792.
- <sup>39</sup> Lewis B.G., Johnson C.M., Broyer T.C., *Plant Soil*, 1974, 40, 107.
- <sup>40</sup> Duckart E.C., Waldron L.J., Donner H.E., *Soil Sci.*, 1992, 53, 94.
- <sup>41</sup> Aro A., Alfthan G., Varo P., *Analyst*, 1995, 120, 841.
- <sup>42</sup> Gautier M.P., *Analisis*, 1997, 25, 22.
- <sup>43</sup> McNeal J., Balistrieri L.S., *Selenium in Agriculture and the Environment*, 1989, pp 1-14. Jacobs L.W. (Ed). SSSA Special Publ. No. 23, Madison, Wisconsin, EEUU.
- <sup>44</sup> Doran J.W., *Adv. Microbiol. Ecology*, 1982, 6, 1.
- <sup>45</sup> Oremland R.S., *Selenium in the Environment*, 1994, pp 389-420. Frankenberger W.T., Benson J., Benson S. (Eds). Marcel-Dekker, Inc. Nueva York.
- <sup>46</sup> Oremland R.S., Hollibaugh J.T., Maest A.S., Presser T.S., Miller L.G., Culbertson C.W., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55, 2333.
- <sup>47</sup> Lortie L., Gould W.D., Rajan S., McCready R.G.L., Cheng K.J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58, 4042.
- <sup>48</sup> Losi M.E., Frankenberger W.T., *Soil Sci.*, 1997, 162, 692.
- <sup>49</sup> Luoma S.N., Presser T.S., *USGS report 00-416*, 2000.
- <sup>50</sup> Schwarz K., Foltz C.M., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, 79, 3292.
- <sup>51</sup> Van Dael P., Deelstra H., *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1993, 39, 2040.

- <sup>52</sup> Flohé J., Brigelius-Flohé R., Böck A., Gärtner R., Meyer O., Flohé L., *Biol. Chem.*, 2000, 381, 849.
- <sup>53</sup> Birringere M., Pilaqa S., Flohé L., *Nat. Prod. Rep.*, 2002, 19, 693.
- <sup>54</sup> Flohé L., Günzler W.A., Schock H.H., *FEBS Letters*, 1973, 32, 132.
- <sup>55</sup> Holben D.H., Smith A.M., *J. of the American Dietetic Association*, 1999, 99(7), 836.
- <sup>56</sup> Fang Y.Z., Yang S., Wu G., *Nutrition*, 2002, 18, 872.
- <sup>57</sup> Daniels L.A., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1996, 54, 190.
- <sup>58</sup> Patching S.G., Gardiner P.H.E., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 1999, 13, 193.
- <sup>59</sup> Burk R.F., Hill K.E., *Annu. Rev. Nutr.*, 1993, 13, 65.
- <sup>60</sup> Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D., *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, 57, 134.
- <sup>61</sup> Burk R.F., Gregory P.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, 213, 73.
- <sup>62</sup> Yang J.G., Hill K.E., Burk R.F., *J. Nutr.*, 1989, 119, 1010.
- <sup>63</sup> Sunde R.A., *Annu. Rev. Nutr.*, 1990, 10, 451.
- <sup>64</sup> Chu F.F., Doroshov J.H., Esworhty R.S., *J. Biol Chem.*, 1993, 268, 2571.
- <sup>65</sup> Diplock A.T., *Molecular Aspects of Medicine*, 1994, 15, 295.
- <sup>66</sup> Bhattacharya I.D., Picciano M.F., Milner J.A., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1988, 18, 59.
- <sup>67</sup> Avissar N., Ornt D.B., Yagil Y., Horowitz S., Watkins R.H., Kerl E.A., Takahashi K., Palmer I.S., Cohen H.J., *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, C367.
- <sup>68</sup> Ursini F., Maiorino M., Greogolin C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 839, 62.
- <sup>69</sup> Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 454.
- <sup>70</sup> Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1045, 252.
- <sup>71</sup> Patrick N.D.L., *Alternative Medicine Review*, 2004, 9, 239.
- <sup>72</sup> Gladishev V.N., Hatfield D.L., *J. Biomed. Sci.*, 1999, 6, 151.
- <sup>73</sup> Himeno S., Imura N., *J. of Health Science*, 2000, 46(6), 393.
- <sup>74</sup> Larsen P.R., Berry M.J., *Annu. Rev. Nutr.*, 1995, 15, 323.
- <sup>75</sup> Behne D., Hammel C., Pfeifer H., Röthlein D., Gessner H., Kyriakopoulos A., *Analyst*, 1998, 123, 871.
- <sup>76</sup> Rayman M., *Lancet*, 2003, 356, 233.
- <sup>77</sup> Germain D.L., *Selenium, its Molecular Biology and Role in Human Health*, 2001, pp 69-81. Hatfield D.L (Ed). Kluwer Academic Publishers, Boston.
- <sup>78</sup> Mustacich D., Powis G., *J. Broche.*, 2000, 346, 1.
- <sup>79</sup> Holmgren A., Bjornstedt M., *Methods Enzymol.*, 1995, 252, 199.
- <sup>80</sup> Gallegos A., Berggren M., Gasdaska J.R., Powis G., *Cancer Res.*, 1997, 57, 4965.
- <sup>81</sup> Safe practices for parenteral nutrition formulations. *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 1998, 22, 49.

- <sup>82</sup> Guimaraes M.J, Peterson D., Vicari A., Cocks B.G., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Ferrick D.A., Kastelein R.A., Bazan J.F., Zlotnik A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 15086.
- <sup>83</sup> Stadtman T.C., *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 65, 83.
- <sup>84</sup> Burk R.F., Hill K.E., *Bioassays*, 1999, 21, 231.
- <sup>85</sup> Hill K.E., Loyd R.S., Yang J.G., Read R., Burk R.F., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 10050.
- <sup>86</sup> Persson-Moschos M., Huang W., Srikumar T.S., Åkesson B., *Analyst*, 1995, 120, 833.
- <sup>87</sup> Suzuki K.T., Ishiwata K., Ogra Y., *Analyst*, 1999, 124, 1749.
- <sup>88</sup> Arteel G.E., Sies H., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2001, 10, 153.
- <sup>89</sup> Frieden E., *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*, 1984, Frieden E. (Ed). Plenum Press, Nueva York.
- <sup>90</sup> Edmonds J.S., Morita M., *Appl. Organomet. Chem.*, 2000, 14, 133.
- <sup>91</sup> Suzuki K.T., Ogra Y., *Phosphorus Sulfur Silicon*, 2001, 171, 135.
- <sup>92</sup> Yoneda S., Suzuki K.T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, 143, 274.
- <sup>93</sup> Yoneda S., Suzuki K.T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 231, 7.
- <sup>94</sup> Suzuki K.T., Sasakura C., Yoneda S., *Biochem. Biophys. Acta*, 1998, 1429, 102.
- <sup>95</sup> Sasakura S., Suzuki T.T., *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 7.1, 159.
- <sup>96</sup> Whanger P.D., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, 57, 1846.
- <sup>97</sup> Roveri A., Casasco C., Maiorino M., Dalan P., Calligaro A., Ursini F., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 6142.
- <sup>98</sup> Roveri A., Maiorino M., Nissii C., Ursini F., *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1208, 211.
- <sup>99</sup> Müller C., Wringler K., Brigelius-Flohé R., *Biol. Chem.*, 2003, 384, 11.
- <sup>100</sup> Brigelius-Flohé R., *Free Radical & Medicine*, 1999, 27 (9/10), 951.
- <sup>101</sup> Behne D., Hilmert H., Scheid S., Gessner H., Elger W., *Biochem. Biophys. Acta*, 1988, 966, 12.
- <sup>102</sup> Behne D., Weiss-Nowak C., Kalcklösch M., Westphal C., Gessner H., Kyriakopoulos A., *Analyst*, 1995, 120, 823.
- <sup>103</sup> Association of Official Analytical Chemists, *Official methods of analysis*, Vol. 1, 1990, pp. 237. Arlington.
- <sup>104</sup> Cámara C., Cobo M.G., Palacios M.A., Muñoz R., Donard O.F.X., *Quality Assurance for Environmental Analysis*, 1995, pp. 235-262. Quevaullier, Maier, Griepink (Eds). Elsevier Science.
- <sup>105</sup> Lockitch L., *Clin. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1989, 27, 483.
- <sup>106</sup> Barrington J.W., Lindsay P., James D., Smith S., Bowen-Simpkins P., *J. Obstet. Gynaecol.*, 1997, 17, 199.
- <sup>107</sup> Chen J.M., Berry M.J., *J. Neurochem.*, 2003, 86, 1.
- <sup>108</sup> Vila M., *Rev. Cien.*, 200, 25-26, 145.
- <sup>109</sup> Clark L.C., Combs G.F., Turnbull B.W., *J. Am. Med. Assoc.*, 1996, 276, 1957.

- <sup>110</sup> Spallholz J.E., *The Bulletin of Selenium-Tellurim Development Association*, 2001, May.
- <sup>111</sup> Ip C., *J. Nutr.*, 1998, 128, 1845.
- <sup>112</sup> Ip C., Lisk D.J., *Carcinogenesis*, 1994, 15, 573.
- <sup>113</sup> Thompson H.J., Wilson A., Lu J., Singh M., Jlang C., Upadhyaya P., El-Bayoumy K., Ip C., *Carcinogenesis*, 1994, 15, 183.
- <sup>114</sup> Sugie S., Tanaka T., El-Bayoumy K., *J. Health Sci.*, 2000, 46, 422.
- <sup>115</sup> Combs G.F., Gray W.P., *Pharmacol. Ther.*, 1998, 79, 179.
- <sup>116</sup> Spallholz J.E., *The Bulletin of Selenium-Tellurim Development Association*, 2001, October, 1
- <sup>117</sup> Combs F.G., Junxuan L., *Selenium, its Molecular Biology and Role in Human Health*, 2001, pp 205-217. Hatfield D.L. (Ed). Kluwer Academic Publishers, Boston.
- <sup>118</sup> Ganther H.E., *Carcinogenesis*, 1999, 20, 1666.
- <sup>119</sup> Jiang W., Zhu Z., Ganther H.E., Ip C., Thomson H.J., *Cancer Lett.*, 2001, 162, 167.
- <sup>120</sup> Calvo A., Xiao N., Kang J., Best C.J., Leiva I., Emmert-Burck M.R., Jorcyk C., Green J.E., *Cancer Res.*, 2002, 62, 5325.
- <sup>121</sup> Levander O.A., *Selenium, its Molecular Biology and Role in Human Health*, 2001, pp 307-309. Hatfield D.L. (Ed). Kluwer Academic Publishers, Boston.
- <sup>122</sup> Högber J., Alexander J., *Handbook on the Toxicology of Metals*, 1986, Vol II, pp. 482-520, Fridberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. (Eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- <sup>123</sup> Yang G., Wang S., Zhou R., Sun S., *Am. J.Clin. Nutr.*, 1983, 37, 872.
- <sup>124</sup> Olson O.E., *J. Am. Coll. Toxicol.*, 1986, 5, 45.
- <sup>125</sup> Herrero E., Rojas P., *Rev. Cien.*, 2000, 25-26, 1.
- <sup>126</sup> Helzlsouer K., Jacobs R., Morris S., *Fed. Proc.*, 1985, 44, 1670.
- <sup>127</sup> Shiobara Y., Ogra Y., Suzuki K.T., *Analyst*, 1999, 124, 1237.
- <sup>128</sup> Suzuki K.T., Ogra Y., *Food Addit. Contam.*, 2002, 19, 974.
- <sup>129</sup> Sunde R.A., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, 61, 1891.
- <sup>130</sup> Hsich H.S., Ganther H.E., *Biochemistry*, 1975, 14, 1632.
- <sup>131</sup> Thomson H.J., *Selenium, its Molecular Biology and Role in Human Health*, 2001, pp 284-289. Hatfield D.L. (Ed). Kluwer Academic Publishers, Boston.
- <sup>132</sup> Ogra Y., Ishiwat K., Takayama H., Aimi N., Suzuki K.T., *J. Chromatogr. B*, 2002, 767, 301.
- <sup>133</sup> Kobayashi Y., Ogra Y., Ishiwata K., Takayama H., Aiii N., Suzuki K.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 15932.
- <sup>134</sup> Nakamuro K., Nakanishi K., Okuno T., Hasegawa T., Sayato Y., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 1997, 43, 182.
- <sup>135</sup> Okuno T., Kubota T., Kuroda T., Ueno H., Nakamuro K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001, 176(1), 18.

- <sup>136</sup> Shiobara Y., Yoshida T., Suzuki K.T., *Toxicol. Appl. Pharmac.*, 1998, 152, 309.
- <sup>137</sup> Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donard O.F.X., Quevauviller P., *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*, 2001. Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donard O.F.X., Quevauviller P. (Eds). Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- <sup>138</sup> Litov R.E., Combs G.F., *Pediatrics*, 1991, 87, 339.
- <sup>139</sup> Hazell T., *Word Rev. Nutr. Diet*, 1985, 46, 1.
- <sup>140</sup> Levander O.A., *Trace Elements in Human and animal Nutrition: Selenium*, 1985, pp. 209-279, Merz W. (Ed), Academic Press, Orlando, Florida.
- <sup>141</sup> Ortuño J., Ros G., Periago M.J., Martínez C., López G., *Food Sci. Techn. Intern.*, 1996, 2, 135.
- <sup>142</sup> Fenwick G.R., Heaney R.K., *Food Chem.*, 1983, 11, 249.
- <sup>143</sup> MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), *Dieta alimentaria española 1991*. MAPA. Dirección General de Política Alimentaria, Madrid.
- <sup>144</sup> O'Dell B.L., *Trace Elements in Nutrition of Children: Bioavailability and interaction among trace elements*, pp 41-62. Chandra R.R. (Ed), Raven Press, Nueva York.
- <sup>145</sup> Sanz M., Díaz C., *Clin. Chem.*, 1993, 39, 10, 2040.
- <sup>146</sup> Foster L.H., Sumar S., *Nutr. Food Sci.*, 1995, 5, 17.
- <sup>147</sup> Moser-Veillon P.B., Mangels A.R., Patterson K.Y., Veillon C., *Analyst*, 1992, 177, 559.
- <sup>148</sup> Haschke F., Ziegler E.E., Edwards B.B., Fomon S.J., *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 1986, 5, 768.
- <sup>149</sup> Fox J.M., *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 1992, 14, 4, 275.
- <sup>150</sup> Thomson C.K., Robinson M.F., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1986, 44, 659.
- <sup>151</sup> Oster O., Schmiedel G., Prellwitz W., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1988, 15, 23.
- <sup>152</sup> Schrauzer G.N., *J. Nutr.*, 2000, 130, 1653.
- <sup>153</sup> Thomson C.D., *Analyst*, 1998, 123, 827.
- <sup>154</sup> Swanson C.A., Patterson B.H., Levander O.A., Veillon C., Taylor P., Helzsouer K., McAdam P.A., Zech L.A., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 54, 917.
- <sup>155</sup> Patterson B., Levander O., Helzsouer K., McAdam P., Lewis S., Taylor P., Veillon C., Zech L.A., *Am. J. Physiol.*, 1989, 257, R556.
- <sup>156</sup> Chansler M.W., Mutanen M., Morris V.C., Levander O.A., *Nutr. Res.*, 1986, 6, 1419.
- <sup>157</sup> Mutanen M., *Intert. J. Vit. Nutr. Res.*, 1986, 56, 297.
- <sup>158</sup> Meltzer H.M., Bibow K., Paulse I.T., Mundal H.H., Norheim G., Holm H., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1993, 36, 229.
- <sup>159</sup> Wen Y.H., Davis R.L., Shi B., Chen J.J., Chen L., Boylan M., Spallholz J.E., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1997, 58, 43.
- <sup>160</sup> Ip C., Lisk D.J., *Nutr. Cancer*, 1993, 20, 129.
- <sup>161</sup> Nève J., Henry M., Peretz A., Mareschi J.P., *Can. Nutr. Diét. XXII*, 2, 145.

- <sup>162</sup> Shen L., Dael P.V., Luten J., Deelstra H., *Intern. J. Food Sci. Nutr.*, 1996, 47, 75.
- <sup>163</sup> Barberá R., Farré R., *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 1992, 32, 381.
- <sup>164</sup> Luten J.B., Bouquet W., Burggraaf M., Rus J., *Analytical Chemistry in Medicine and Biology: Trace Elements*, 1987, pp 509. Bratter P., Schramel P. (Eds). Galter de Gruter, Nueva York.
- <sup>165</sup> Hassan S., Hakkarainen J., Lindberg P.J., *Vet. Med.*, 1987, 34, 353.
- <sup>166</sup> Crews H.M., Clarke P.A., Lewis D.J., Owen L.M., Strutt P.R., *J. Anal. Atomic. Spectrom.*, 1996, 11, 1177.
- <sup>167</sup> Vázquez M.S., Gutiérrez A.M., Gómez M.M., Palacios M.A., *Química Analítica*, 1994, 13, 144.
- <sup>168</sup> Mason A.C., *Trace Minerals in Foods: Selenium*, 1988, pp. 325-355. Smith K.T. (Ed). Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- <sup>169</sup> Higgs D.J., Morris V.C., Levander O.A., *J. Agr. Food Chem.*, 1972, 20, 3, 678.



- 
1. **FORMA QUÍMICA Y EFECTO PROTECTOR/ANTAGÓNICO**
  2. **EFECTOS DEL SELENIO EN LA DISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO EN ÓRGANOS Y TEJIDOS**
  3. **POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL SELENIO FRENTE A LA TOXICIDAD DEL MERCURIO**
    - 3.1. **REDISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO**
    - 3.2. **COMPETENCIA POR LOS MISMOS PUNTOS DE UNIÓN**
    - 3.3. **FORMACIÓN DE COMPLEJOS Hg-Se**
    - 3.4. **CONVERSIÓN DE LAS FORMAS TÓXICAS DE MERCURIO EN OTRAS FORMAS MENOS TÓXICAS**
    - 3.5. **PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO**
  4. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
-

## INTERACCIÓN MERCURIO-SELENIO

El efecto protector que el selenio ejerce frente a la toxicidad del mercurio se conoce desde hace más de tres décadas siendo descrito por primera vez por Parizek y Ostadalova<sup>1</sup>. Estos investigadores demostraron la desaparición del efecto tóxico del mercurio cuando ambos compuestos (Se(IV) y Hg(II)) eran administrados simultáneamente a ratas. Los riñones de estas ratas no mostraron variaciones a nivel macroscópico o daño histológico, como necrosis en los túbulos renales, a diferencia de lo que ocurría cuando sólo se les administraba mercurio. Aunque este estudio es considerado como el primer trabajo sobre la interacción mercurio-selenio, hay algunos estudios descritos con anterioridad que podrían haber conducido al inicio de la investigación en esta área mucho antes<sup>2</sup>. Por ejemplo, en los tejidos de las víctimas del desastre de Minamata se encontraron concentraciones inusualmente elevadas no sólo de mercurio, sino de selenio. Doce años más tarde, Ganther y col.<sup>3</sup> mostraron el efecto paliativo de la toxicidad del metilmercurio por parte del selenito sódico.

A partir de este momento, son muchos los estudios que han tratado este fenómeno, promoviendo un gran número de investigaciones sobre la posible interacción mercurio-selenio en distintos organismos y sistemas biológicos, al igual que numerosos estudios sobre posibles mecanismos de protección.

Dentro de las distintas líneas de investigación existentes, cabe destacar la dirigida al estudio de varios organismos que a pesar de presentar elevadas concentraciones de mercurio no presentaron signos aparentes de envenenamiento. Para una mejor comprensión de este fenómeno, no sólo se han realizado determinaciones de los contenidos de mercurio total, sino que igualmente se han determinado las concentraciones de selenio y se han estudiado posibles relaciones entre estos dos elementos en animales y seres humanos<sup>4</sup>. Koeman y col.<sup>5,6</sup> encontraron una relación molar 1:1 de mercurio y selenio en hígados de mamíferos marinos. La correlación lineal entre estos elementos fue también observada en estudios posteriores no sólo en mamíferos marinos (focas, orcas, osos polares)<sup>7,8,9,10,11</sup> sino en humanos tanto expuestos ocupacionalmente al mercurio (mineros)<sup>12</sup> como no expuestos<sup>13</sup>. La relación equimolar se observó sólo cuando la concentración de mercurio superaba un determinado valor (1-100 mg kg<sup>-1</sup> dependiendo de la especie analizada), lo que sugiere un proceso de detoxificación en el que el selenio se ve involucrado cuando el mercurio alcanza un determinado nivel.

Los niveles de mercurio y selenio más altos que se han descrito en la bibliografía en mamíferos marinos y aves alcanzan los siguientes valores: 510 ppm y 270 ppm de mercurio y selenio respectivamente, en hígados de focas *Phoca hispida*<sup>14</sup> y 430 ppm y 120 ppm de mercurio y selenio respectivamente, en hígado del águila *Haliaeetus leucocephalus*<sup>15</sup>. A pesar de estos valores tan extremadamente altos, estos animales no

mostraron ningún signo de intoxicación. Este hecho sugiere que la presencia de ambos elementos puede proporcionar protección al animal mediante un efecto protector del selenio frente a la toxicidad causada por el mercurio y viceversa.

Sin embargo, la correlación entre las concentraciones de mercurio y selenio presente en pescados no está bien establecida. Los resultados obtenidos por distintos autores no son concluyentes. Ganther y Sunde<sup>16</sup> demostraron que el contenido de selenio en atún era superior en aquellos individuos que presentaban un elevado contenido en mercurio, alcanzando relaciones 1:1 en los animales más contaminados. En el músculo del atún *Thunnus alalunga* la relación selenio-mercurio también tendió a alcanzar la unidad<sup>17</sup>. Lo mismo se observó en las gónadas del pez espada<sup>18</sup>. Sin embargo, en otros estudios se detectó un exceso de selenio en las muestras de pescado analizadas<sup>19,20,21</sup>.

Consecuentemente, los resultados de estos estudios sugieren que la relación molar 1:1 encontrada en mamíferos marinos no se mantiene a lo largo de la cadena trófica y es independiente de la relación molar de los eslabones inferiores de dicha cadena. Esto puede explicarse por los distintos mecanismos de interacción que tienen lugar dentro de los organismos.

Desgraciadamente, los estudios realizados en los pescados raramente incluyen la concentración de estos elementos en agua y en los peces que constituyen su dieta, por lo tanto, es difícil establecer si la relación mercurio-selenio se correlaciona o no con la que hay presente en la dieta.

Experimentalmente se ha observado que los niveles de selenio presentes en pescados pueden ser lo suficientemente elevados como para proteger a los organismos de la toxicidad del mercurio. Ganther y col. describieron como la vida de codornices alimentadas con metilmercurio se veía prolongada cuando se las administraba conjuntamente atún incorporado a la dieta. Otro ejemplo del estudio sobre el efecto protector del selenio procedente de pescado fue llevado a cabo por Friedman y col.<sup>22</sup>. Los resultados mostraron que las ratas a las que se había administrado metilmercurio y pez espada en la dieta no reflejaban ningún signo de envenenamiento por mercurio caracterizado por sus efectos neurotóxicos, mientras que las ratas que no habían sido alimentadas con el pez espada sí los manifestaron. La determinación de la concentración de selenio en el pez espada reveló niveles que duplicaban el contenido en mercurio. Por lo tanto, se sugirió que el exceso de selenio existente en el pez espada era capaz de proteger a las ratas del metilmercurio administrado.

Otros experimentos con animales ponen de manifiesto varios efectos protectores del selenio ante la toxicidad del mercurio. Algunos estudios llevados a cabo con ratas destacan una menor mortalidad, mejores índices de crecimiento y ganancia de peso en los animales tratados con selenio y mercurio si se comparan con los tratados con mercurio exclusivamente<sup>23,24,25</sup>. En el pez pequeño de agua dulce *Semotilus atromaculatus* el

tratamiento con dióxido de selenio previo a la administración de mercurio (como cloruro de mercurio) supuso un menor índice de mortalidad en comparación con el grupo que fue tratado únicamente con mercurio. Además, a bajas concentraciones de mercurio (0.1-0.16 ppm) se observó una menor acumulación de este elemento en los animales pretratados con selenio<sup>26</sup>. En los peces *Phoxinus phoxinus* expuestos a mercurio junto con selenio se obtuvieron índices de supervivencia significativamente mayores que los expuestos únicamente a mercurio<sup>27</sup>. En el mejillón *Mytilus edulis*, los tests de toxicidad letal aguda llevados a cabo empleando tratamientos de mercurio y mercurio-selenio demostraron que la mejor protección se obtenía mediante la adición simultánea (equimolar) de selenio y mercurio<sup>28</sup>. El selenio presente en sedimentos también ha sido eficaz en la inhibición de la asimilación del metilmercurio en el gusano *Lumbriculus variegatus*<sup>29</sup>.

A la inversa, los efectos tóxicos del selenio pueden ser también reducidos por el mercurio. La adición de bajos niveles de cloruro de mercurio en dietas que contenían concentraciones tóxicas de selenio protegió a los pollos objeto de estudio de la inhibición del crecimiento y de la mortalidad debidas al selenio. Conforme se incrementó el mercurio en la dieta, el efecto del selenio disminuía progresivamente, aunque el mayor nivel de mercurio empleado fue aquel que suponía una relación molar con el selenio igual a la unidad<sup>30</sup>.

Estudios relacionados con cultivos de tejido nervioso del cerebelo de ratas también han demostrado que el selenito y el seleniato sódico proporcionan un efecto protector importante frente a la neurotoxicidad del metilmercurio. Concentraciones de seleniato sódico entre  $0.2 \cdot 10^{-5}$  y  $1.0 \cdot 10^{-5}$  M protegieron los tejidos nerviosos de la toxicidad ocasionada por concentraciones de metilmercurio entre  $1.0 \cdot 10^{-5}$  y  $1.5 \cdot 10^{-5}$  M<sup>31</sup>. Este hecho sugiere que concentraciones molares de selenio inferiores a las de mercurio son capaces de proteger de la toxicidad de este último.

A parte de los estudios realizados en laboratorios se han llevado a cabo estudios en ecosistemas experimentales para poder demostrar las posibles interacciones mercurio-selenio. Turner<sup>32</sup> demostró que la habilidad del selenio para reducir la bioacumulación del mercurio en la biota dependía no sólo de la dosis sino de la posición del organismo en la cadena alimentaria. En pescados, la reducción fue notable y proporcional a la cantidad de selenio acumulada, sin embargo, en los niveles más bajos de la cadena, el efecto del selenio fue muy pequeño o incluso nulo. Además, hay indicios de que el selenio incorporado a ecosistemas acuáticos y por lo tanto, incorporado subsecuentemente a la cadena trófica podría interferir en la biomagnificación del mercurio. El incremento en la cantidad de selenio redujo la asimilación de mercurio procedente de la dieta entre un 10 y un 50%. Una reducción mayor (75-85%) ha sido descrita por Paulsson y Lindbergh después de incorporar en Suecia selenio a algunos lagos y medir sus efectos durante un período de tres años<sup>33</sup>.

Asimismo, el selenio se ha empleado como un agente paliativo de la acumulación de mercurio en sistemas acuáticos con problemas severos de contaminación. La adición de selenio ( $100 \mu\text{g Se l}^{-1}$ ) permitió que la acumulación de mercurio por parte de pescados y otra biota acuática se viera disminuida por un factor de 2, aunque el efecto fue dependiente de la dosis y de las especies<sup>34</sup>.

## 1. FORMA QUÍMICA Y EFECTO PROTECTOR/ANTAGONISTA Se-Hg.

Como se ha comentado anteriormente la forma química del mercurio y selenio afecta a la toxicología de ambos elementos. Por ello, las interacciones entre el mercurio y el selenio dependerán, en gran medida, de las formas químicas en que ambos elementos se administren.

En estudios con animales la cantidad de mercurio incorporada a través de la alimentación se ha visto afectada por la concentración y forma química de selenio presente en la dieta. Así, Turne y col.<sup>35</sup> comprobaron como el lucio *Esox lucius* experimentaba una reducción entre un 5 y 11% en la asimilación del mercurio procedente de la dieta cuando se incrementaba la cantidad de selenio en su alimentación (a base de la perca *Perca flavescens*). Sin embargo, cuando ambos elementos se administraban en disolución acuosa, la concentración de mercurio en varios tejidos de este pescado no se vio afectada por el estatus de selenio del animal. El mercurio y selenio empleados para tratar el agua y el alimento del lucio (perca) se encontraba en forma de  $^{203}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{H}_2\text{SeO}_3$ . Este hecho sugiere que la diferente asimilación del mercurio observada puede ser debida, en parte, a posibles transformaciones de ambos elementos (mercurio y selenio) previo a su consumo.

La efectividad del selenio procedente de pescados conocidos por tener elevadas concentraciones de este elemento, como el atún, para detoxificar el mercurio se ha comparado con la efectividad del selenio inorgánico para poder determinar si existe alguna diferencia en el grado de protección proporcionado por ambas formas de selenio. El selenio administrado a través del atún o en forma de selenito sódico mostró el mismo efecto protector en ratas expuestas a metilmercurio. Ambos mejoraron los índices de crecimiento y disminuyeron la pérdida de peso y el índice de mortalidad de las ratas. Sin embargo, el selenito fue más efectivo que el selenio procedente del atún en la prevención de manifestaciones neurológicas de la toxicidad del mercurio<sup>36</sup>.

Puesto que el riñón es uno de los órganos más susceptibles al envenenamiento por mercurio, Fang<sup>37</sup> ha realizado estudios de la efectividad de cuatro compuestos diferentes de selenio para reducir los niveles renales de mercurio (administrado como cloruro de mercurio). Los resultados mostraron que si se comparan equimolarmente, la eficiencia de los cuatro compuestos de selenio sigue el siguiente orden de efectividad:

selenometionina>selenocistina>seleniato>selenito. Los compuestos orgánicos de selenio parecen ser más efectivos que las formas inorgánicas en la prevención de la acumulación del mercurio en los órganos diana.

Sin embargo, otros estudios han mostrado diferentes resultados. Henz y Hoffman<sup>15</sup> encontraron que la selenometionina y el metilmercurio interactuaban de distinta forma en patos jóvenes y adultos de la especie *Anas platyrhynchos*. La selenometionina protegía a los patos adultos de la toxicidad del metilmercurio, pero acusaba los efectos tóxicos del metilmercurio en los individuos jóvenes (menor supervivencia y crecimiento). Un estudio reciente revela que el selenito y seleniato no afectan significativamente a la acumulación de Hg(II) o metilmercurio en diatomeas y mejillones, pero, la selenometionina favoreció la bioacumulación del mercurio inorgánico e inhibió significativamente la bioacumulación del metilmercurio<sup>38</sup>. Sharma y Davis<sup>39</sup> observaron una leve protección frente al cloruro de mercurio y metilmercurio del selenio cuando este era administrado en forma de selenito sódico al pez *Carasius auratus*, mientras que la selenometionina no mostró ningún signo de protección. La comparación de dos formas de selenio administradas a ratas también demostró que el selenito sódico fue ligeramente más efectivo que la selenometionina en la reducción de los síntomas de toxicidad del mercurio<sup>24,40,41</sup>. La neurotoxicidad del metilmercurio también se ha visto prevenida por el seleniato y el selenito sódico, aunque el selenito fue cuatro veces más efectivo que el seleniato. Dosis tan bajas como  $0.8 \cdot 10^{-5}$  M de seleniato y  $0.2 \cdot 10^{-5}$  M selenito fueron efectivas frente a una concentración de  $1 \cdot 10^{-5}$  M de metilmercurio.

Estudios fisiológicos han mostrado que aunque el transporte del metilmercurio se veía favorecido por el selenito, el transporte del cloruro de mercurio se veía de hecho afectado negativamente conforme se incrementaba la cantidad de selenio. El seleniato, por otra parte, incrementó ligeramente el transporte del cloruro de mercurio, a pesar de tener un menor efecto en el transporte del metilmercurio<sup>42</sup>.

Esta variación en los resultados de la efectividad de las diferentes formas químicas de selenio frente a la toxicidad del mercurio es posiblemente indicador de la existencia de distintos mecanismos de actuación en función de la forma en que ambos elementos coexisten y también del tipo de organismos.

La interacción del mercurio con las especies de selenio se ve también afectada por la forma química del propio mercurio. Estudios de bioacumulación de selenio y mercurio en la ostra azul *Mytilus edulis*<sup>43</sup> demostraron, que en ausencia de mercurio las ostras acumulaban selenio inorgánico y no acumulaban selenio orgánico. Sin embargo, cuando se adicionó mercurio inorgánico al agua ( $30 \mu\text{g Hg l}^{-1}$ ) la acumulación del selenio inorgánico se duplicó, y se triplicó con la adición de la misma cantidad de metilmercurio. Incluso el selenio orgánico se convirtió en una especie biodisponible en presencia de metilmercurio. Sin embargo, este fenómeno no fue recíproco, es decir, la presencia de

selenio no tuvo ningún efecto en la acumulación del mercurio independientemente de su concentración y forma química.

El empleo de cloruro de mercurio y metilmercurio en presencia de selenito, selenitato y selenometionina marcados isotópicamente ha permitido evaluar la interacción de distintas formas de mercurio y selenio durante su absorción intestinal. El metilmercurio no afectó a la absorción y solubilidad de la selenometionina en el intestino delgado de los pollos. Sin embargo, el mercurio inorgánico sí disminuyó la absorción del selenito y seleniato, sugiriendo una mayor interacción entre el selenio y el mercurio en el lumen intestinal cuando están en forma inorgánica<sup>44</sup>.

Varios estudios relacionados con el efecto de los diferentes compuestos de mercurio (cloruro de mercurio, metilmercurio y acetato de fenilmercurio) en la distribución del selenio no han permitido concluir que compuesto es más efectivo que otro en la alteración de los niveles de selenio en los tejidos. El metilmercurio incrementó la concentración de selenio en el cerebro, mientras que el cloruro de mercurio y acetato de fenilmercurio causaron su reducción. Por otra parte, el contenido de selenio en el hígado disminuyó con la adición de metilmercurio, mientras que el cloruro de mercurio y el acetato de fenilmercurio proporcionaron una mayor acumulación del selenio en los riñones. Los niveles de selenio en la sangre también se vieron incrementados por el metilmercurio y acetato de fenilmercurio, pero no por el cloruro de mercurio. Asimismo, la toxicidad del acetato de fenilmercurio en pollos disminuyó en presencia de selenio en forma de difenilselenio. Sin embargo, el mercurio como cloruro de mercurio no mostró una interacción biológica significativa con el difenilselenio. Además, hay indicaciones de que la interacción del acetato de fenilmercurio y el difenilselenio es diferente a la del cloruro de mercurio y el dióxido de selenio. El efecto del difenilselenio en la toxicidad del acetato del fenilmercurio fue evidente en la relación molar 1:4 a diferencia de la relación molar 1:1 que se determinó como la más eficiente en la interacción cloruro de mercurio con dióxido de selenio. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las interacciones entre los distintos compuestos de selenio y mercurio son extremadamente complejas y no se ha conseguido su dilucidación.

La presencia de otros elementos y compuesto pueden también modificar la interacción entre el mercurio y el selenio. Por ejemplo, la presencia de arsénico en la forma arsenito sódico, alteró la habilidad del selenio para modificar la toxicidad del metilmercurio en codornices. Aunque el arsenito por sí solo no ejerce un efecto protector frente a la toxicidad del metilmercurio, mejoró la efectividad del selenito incrementando la esperanza de vida si se compara con las codornices intoxicadas por mercurio<sup>45</sup>. La combinación de cistina y selenito también supuso un efecto aditivo considerable al reducir la toxicidad del mercurio evaluado mediante el incremento en índices de crecimiento y menor mortalidad en ratas.

## 2. EFECTOS DEL SELENIO EN LA DISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO EN ÓRGANOS Y TEJIDOS

Uno de los efectos observados que el tratamiento con selenio ejerce en animales intoxicados por mercurio es la aparente modificación de la distribución del mercurio en distintos órganos y tejidos. En la Tabla 8 se recoge un resumen de los trabajos que han estudiado esta modificación.

De especial interés es el efecto del selenio en los niveles de mercurio en los riñones, puesto que éste es uno de los órganos más susceptibles a su toxicidad. Por este motivo no sorprende el número elevado de estudios realizados en riñones de animales expuestos a este elemento.

Algunos trabajos con ratas han demostrado que el pre-tratamiento con selenito sódico seguido de la administración de cloruro de mercurio disminuye notablemente la concentración de mercurio en los riñones de estos animales (hasta un 90%)<sup>23,46</sup>, lo que se traduce en una disminución de la bioacumulación del mercurio. Otros autores han observado semejante comportamiento en los riñones de otros animales como el pez *Phoxinus phoxinus*<sup>47</sup>, el pez *Fundulus heteroclitus*<sup>48</sup>, conejos<sup>49</sup> y cerdos<sup>50</sup> después de un tratamiento con selenio.

Por lo tanto, diversos estudios han demostrado que el selenito no sólo afecta a la asimilación de mercurio, sino que también a su retención en los riñones. Sin embargo, otros estudios han permitido concluir que la presencia de selenio incrementa la concentración de mercurio inorgánico en estos órganos<sup>51</sup>. Junto con este incremento en la concentración de mercurio en los riñones, los niveles de selenio también se incrementaron cuando ambos elementos fueron administrados simultáneamente<sup>52</sup>. La administración de selenito y mercurio inorgánico también produce una reducción de la excreción urinaria del mercurio en ratas si se compara cuando sólo se administraba mercurio<sup>53,54</sup>.

A diferencia de lo que ocurre en los riñones, en el hígado de ratas tratadas con selenito sódico, independientemente de la forma de mercurio administrada, se han encontrado niveles superiores de mercurio. Los mismos resultados fueron observados por distintos grupos de investigación en los mismos animales cuando se administraron dosis equimolares de mercurio y selenio<sup>37,55,56</sup>. Por otro lado, en el hígado de un pato<sup>15</sup> y del pez *Fundulus heteroclitus*, las concentraciones de mercurio no fueron modificadas significativamente cuando se les administró selenio.

Varios estudios llevados a cabo con distintas aves ponen de manifiesto los distintos comportamientos ante la co-administración de selenio y mercurio en función del ave, del nivel y forma del mercurio administrado, del sexo y de la edad de los individuos.



**Tabla 8.** Principales estudios del efecto del selenio en la distribución del mercurio

MERCURIO	SELENIO	ESPECIE ANIMAL	EFEECTO	REF
Hg(II)	Selenito sódico	Rata	[Hg] disminuye en el riñón	46
Hg(II)	Selenito sódico	Pez	[Hg] disminuye en el riñón	47
Hg(II)	Selenito sódico	Pez	[Hg] disminuye en el riñón, aumenta en el hígado	48
Hg(II)	Selenito sódico	Conejo	[Hg] disminuye en el riñón	49
Hg(II)	Selenito sódico	Cerdo	[Hg] disminuye en el riñón, aumenta en el bazo, el hígado y los pulmones [Se] aumenta en el bazo, el hígado, los pulmones y el riñón	50
Hg(II)	Selenito sódico	Rata	[Hg] disminuye en el riñón	23
Metilmercurio			[Hg] aumenta en el bazo y en el hígado, no se modifica en el riñón	
Hg(II)	Selenito sódico	Rata	[Hg] aumenta en el hígado	56
Metilmercurio	Selenometionina	Rata	[Hg] aumenta en la sangre y el hígado, disminuye el porcentaje de MeHg	55
	SeO <sub>2</sub>		[Hg] disminuye en la sangre y en el hígado	
Metilmercurio	Selenito sódico	Codorniz	[Hg] aumenta en el cerebro y en el hígado [Se] aumenta en la sangre, el cerebro, el hígado y el riñón	60
Metilmercurio	Selenito sódico	Ratón	[Hg] aumenta en cerebro, no se modifica en la sangre y en el riñón	57
Metilmercurio	Selenito sódico	Pollo	[Hg] disminuye en el hígado (~ 50%) y el músculo, no se modifica el nivel en el cerebro ↓ mortalidad	61
		Codorniz	[Hg] se duplica en el hígado, no se modifica el nivel en el cerebro ↓ mortalidad	
Metilmercurio	Selenito sódico	Gallina	[Hg] aumenta en el hígado	62
Metilmercurio	Selenito sódico	Codorniz	[Hg] disminuye en el hígado	63
Metilmercurio	Selenito sódico	Cerdo	[Hg] disminuye en la sangre, el hígado, el cerebro y el riñón ↓ excreción	202
Metilmercurio	Selenito sódico	Codorniz	[Hg] disminuye en el hígado	58
Metilmercurio	Selenito sódico	Pollo	[Hg] disminuye en el hígado, efecto varía con el sexo del ave	59
Metilmercurio	Selenometionina	Pato	[Hg] no se modifica efecto antagónico en individuos adultos efecto sinérgico en individuos jóvenes	15
Fenilmercurio	Selenito sódico	Gallina	[Hg] disminuye en el músculo, el hígado y el riñón	64

El-Begerami y col.<sup>60</sup> observaron que codornices alimentadas con metilmercurio (5-30 ppm) junto con selenito sódico (12 ppm) duplicaban el contenido de mercurio en el hígado si se compara respecto a cuando sólo se incluía el mercurio en su dieta. Además, este incremento en la concentración de mercurio vino acompañado por un incremento en la concentración de selenio en la sangre, cerebro, hígado y riñón. Resultados análogos fueron descritos por Sell y Morai<sup>61</sup> quienes alimentaron a codornices con 20 ppm de metilmercurio y 8 ppm de selenito sódico y por Emerick y col.<sup>62</sup> quienes alimentaron a gallinas con ambos elementos simultáneamente. Sin embargo, la adición de selenio y mercurio a pollos supuso la reducción de los niveles de mercurio en el músculo y en el hígado (próximo al 50%), al igual que en los experimentos de Welsh y Soares<sup>63</sup>.

La interacción selenio-mercurio se ha estudiado en general empleando Se(IV), SeMet, Hg(II) y MeHg, pero algunos experimentos han involucrado otras especies como en el caso del selenio el SeO<sub>2</sub>, que administrado conjuntamente con metilmercurio originaba una menor acumulación de mercurio en sangre e hígado, y en el caso del mercurio el fenilmercurio que junto con Se(IV) veía disminuida su concentración en el músculo, hígado y riñón<sup>64</sup>.

El mercurio no acumulado en los riñones se piensa que puede ser redistribuido al músculo. En ratas, se encontró una cantidad de mercurio tres veces superior en el músculo del grupo tratado con selenio que en el grupo donde sólo se había administrado cloruro de mercurio. Este mismo comportamiento también se observó en pez *Fundulus heteroclitus*. El selenio también se incrementó cuando se administró metilmercurio y mercurio inorgánico en este tejido.

Estudios de la interacción mercurio-selenio en sangre de conejo llevados a cabo *in vivo* e *in vitro*, han puesto de manifiesto una mayor asimilación del mercurio por parte de los eritrocitos en comparación con cuando sólo se empleaba metilmercurio. Sin embargo, la incorporación de selenio a la sangre sí se vio reducida en presencia del mercurio<sup>65</sup>. También se observaron incrementos significativos de los niveles de mercurio en ratas, después de un tratamiento con selenio. Por otra parte, Scheline y Schmidt-Nielsen observaron que la sangre del pez *Fundulus heteroclitus* mostraba retenciones 3.5 veces inferiores de mercurio después del tratamiento con selenio.

En el intestino, el selenio favoreció el transporte del mercurio a través del intestino delgado de las ratas. La acumulación del mercurio prácticamente no se vio modificada con la adición del selenito o seleniato en el caso del metilmercurio, pero sí lo hizo en el caso del cloruro de mercurio.

Además, en otros tejidos, tales como cerebro<sup>37,53,66,67</sup>, corazón, páncreas, testículos<sup>23,46</sup> y bazo<sup>23,37</sup>, la presencia de selenio mostró una tendencia general hacia el incremento en el contenido de mercurio.

Por lo tanto, el selenio no sólo no parece manifestar los mismos mecanismos de interacción con el mercurio inorgánico y mercurio orgánico, sino que pone de manifiesto la complejidad de las interacciones selenio-mercurio puesto que dependen no sólo de las distintas formas en que estos elementos están presentes sino de los seres vivos implicados.

### **3. POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL SELENIO FRENTE A LA TOXICIDAD DEL MERCURIO**

A pesar de la gran variedad de estudios existentes y de la información disponible, los mecanismos exactos de interacción entre el mercurio y el selenio no se han conseguido dilucidar. La mayoría de la información disponible proviene de los resultados obtenidos de un gran número de estudios, pero no son del todo concluyentes. A continuación se enumeran y discuten algunos de los posibles mecanismos propuestos sobre la protección efectiva del selenio frente a la toxicidad del mercurio: redistribución del mercurio en presencia de selenio, competencia por los mismos puntos de unión por parte de ambos elementos, formación de un complejo mercurio-selenio, conversión de las formas tóxicas de mercurio en otras formas menos tóxicas y prevención del daño oxidativo. Cada uno de estos posibles mecanismos se va a discutir a continuación (Tabla 9).

#### **3.1. REDISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO**

Algunos estudios indican que la asimilación del mercurio no disminuye por la presencia del selenio, de hecho, a veces se incrementa. También se ha demostrado que en ciertos casos el selenio no favorece la eliminación del mercurio sino su retención. Sin embargo, un número notable de estudios concluyen lo contrario. Esta variedad de resultados indica, como se ha comentado anteriormente, que los mecanismos de protección del selenio frente a la toxicidad del mercurio observados pueden ser extremadamente complejos.

La redistribución del mercurio dentro de los organismos se ha discutido previamente. Se cree que la redirección del mercurio de un órgano a otro, y de una fracción subcelular a otra es uno de los mecanismos generales involucrados en la acción protectora del selenio. Varios estudios muestran que el selenio promueve la redistribución del mercurio de órganos y tejidos altamente sensibles como el riñón a otros menos sensibles (músculo)<sup>46,48</sup>. La reducción de los niveles de mercurio en el riñón podría explicar los resultados obtenidos por Parizek y Ostadalova, quienes no encontraron daño

macroscópico o histológico en el riñón de ratas tratadas con niveles de mercurio y selenio por debajo de la dosis letal.

**Tabla 9.** Mecanismos de protección del selenio frente a la toxicidad del mercurio

<b>POSIBLES MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL SELENIO FRENTE A LA TOXICIDAD DEL MERCURIO</b>	
<b>1. Redistribución del Hg</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Redirección del Hg de órganos y tejidos altamente sensibles a otros menos sensibles</li> <li>◆ Inhibición de la metaloproteínas o bloqueo de la unión del Hg y estas proteínas, alterando así el perfil proteico, favoreciéndose la unión a proteínas de elevado peso molecular</li> </ul>
<b>2. Competencia por los mismos puntos de unión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Hg y Se compiten por los mismos receptores, posiblemente receptores de Se</li> </ul>
<b>3. Formación de complejos Hg-Se</b>	<p style="text-align: center;"><b>Hg(II)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <u>Plasma</u>: selenito se reduce a seleniuro y reacciona con el cloruro de Hg para formar un complejo equimolar Hg-Se que se enlaza a la selenoproteína P (complejo Hg-Se-Selenoproteína P). De esta forma se evita que alcance ciertos tejidos diana</li> <li>◆ <u>Hígado</u>: formación del complejo equimolar Hg-Se unido a especies de elevado peso molecular, posible precursor del HgSe cristalino (tiemanita) encontrado en el lisosoma hepático de mamíferos marinos</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>MeHg</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <u>Sangre</u>: formación de un complejo inestable con relación molar Hg:Se 2:1, posiblemente el seleniuro bis (metilmercúrico) <math>(\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{Se}</math></li> </ul>
<b>4. Conversión de las formas tóxicas de Hg en otras formas menos tóxicas</b>	<p style="text-align: center;"><b>MeHg</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ El selenio favorece la conversión del MeHg a Hg(II)</li> </ul> <p style="text-align: center;"><u>Evidencias:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mamíferos y aves marinas biotransforman lentamente el MeHg de su dieta a Hg(II) en el hígado sin mostrar síntomas de contaminación</li> <li>■ Elevadas concentraciones de Hg(II) encontradas en cerebros de monos alimentados crónicamente con MeHg y selenio <ul style="list-style-type: none"> <li>■ El MeHg puede actuar como donante del grupo metilo para metilar al seleniuro (exhalación de compuestos metilados de Se)</li> </ul> </li> </ul>
<b>5. Prevención del daño oxidativo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Pre-tratamiento con Se puede paliar el efecto inhibitor del MeHg sobre la glutatióna peroxidasa, asegurando la integridad de los componentes biológicos de las células y tejidos vía antioxidación</li> </ul>

En la fracción subcelular soluble de diversos tejidos animales, el mercurio se puede encontrar unido principalmente a metalotioneínas (proteínas de bajo peso molecular), puesto que la formación de metalotioneínas es inducida por la presencia de varios metales, incluido el mercurio<sup>68</sup>. La presencia de selenio puede suponer, a parte de los incrementos en los niveles de mercurio en la fracción soluble, la alteración del perfil proteico, favoreciéndose la formación de moléculas de elevado peso molecular<sup>46,52</sup>. Esto sugiere que el selenio bloquearía de algún modo la unión del mercurio y la metalotioneína o podría inhibir la inducción de estas proteínas. Otros experimentos avalan la tesis de la inducción de la liberación del mercurio enlazado a proteínas por acción del selenio. También se ha demostrado que el selenio permite la liberación del mercurio enlazado a cisteína<sup>69</sup>. Puesto que la cisteína es un componente mayoritario de las metalotioneínas y se conoce que el mercurio interactúa con los grupos sulfhidrilos de este aminoácido, el bloqueo de la inducción de metalotioneínas ejercido por el selenio al mercurio permitiría que el mercurio tuviera la posibilidad de unirse a otras proteínas, posiblemente a través de los grupos sulfhidrilo. Las proteínas de elevado peso molecular a las cuales el mercurio es redirigido no han sido caracterizadas, pero se cree que son menos sensibles al mercurio.

Sin embargo, a diferencia de lo establecido por los estudios anteriores, Burk no observó diferencias significativas en el comportamiento de unión del mercurio al incluir el selenio en la dieta, permaneciendo el mercurio en los riñones unido a las metalotioneínas. No se describió ningún desplazamiento del mercurio a proteínas de mayor peso molecular, por lo que no se ejercería ningún efecto sobre la inducción de las metalotioneínas.

Desgraciadamente la redistribución del mercurio de órganos más sensibles a menos sensibles no puede explicar los resultados de un gran número de estudios. Por ejemplo, el cerebro es un órgano altamente sensible al mercurio, y la presencia de selenio provoca un aumento en la acumulación del mercurio en este órgano. Parece que la redistribución del mercurio no puede explicar satisfactoriamente la reducción del daño neurológico inducido por el selenio, lo que implica que los mecanismos que interviene en la interacción entre estos elementos son muy complejos.

### **3.2. COMPETENCIA POR LOS MISMOS PUNTOS DE UNIÓN**

Las relaciones mercurio-selenio encontradas en pescados comparadas con la concentración de ambos elementos en el medioambiente condujo a la conclusión de que el mercurio y selenio compiten por los mismos receptores localizados en los tejidos animales. Este hecho podría explicar así el antagonismo toxicológico manifestado. Se cree que los puntos de unión son receptores de selenio que incrementan en número con la edad. Es probable que estos receptores puedan ser ocupados por mercurio en función de su

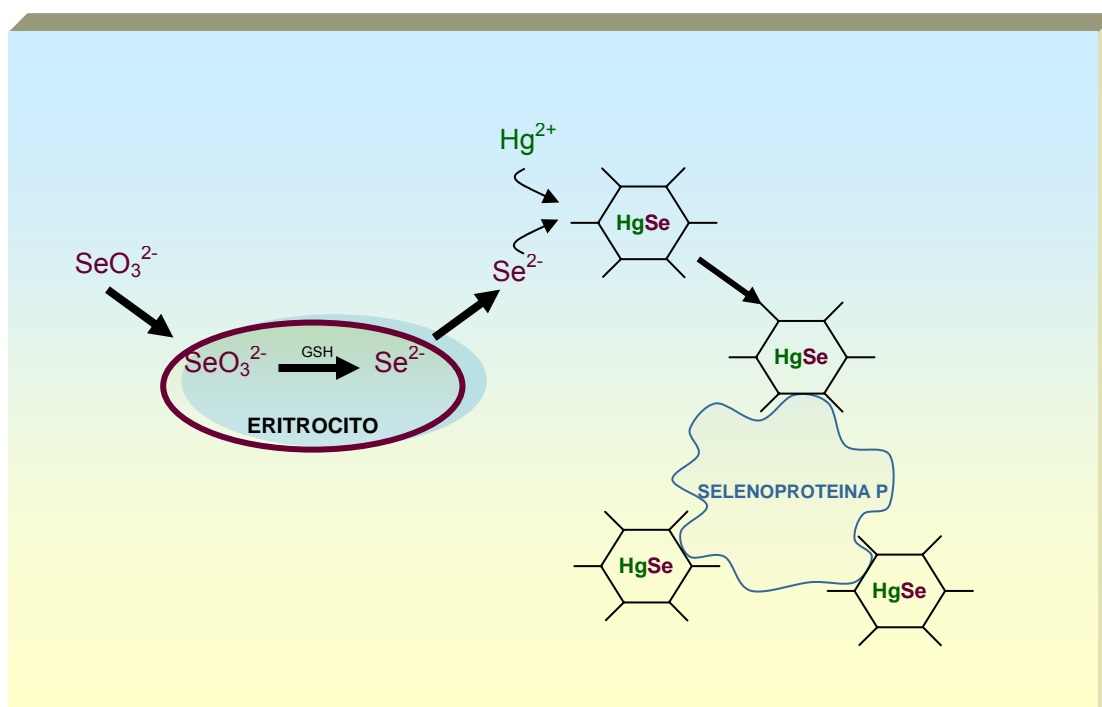
biodisponibilidad en el medioambiente<sup>70</sup>. La idea de competición también se ha empleado no sólo para explicar la variabilidad encontrada en las relaciones mercurio-selenio, sino que también se han empleado para explicar el índice de eliminación de ambos elementos.

En las gambas *Palaemon elegans*, se cree que la membrana permeable de las branquias es la ruta principal por la que se elimina el mercurio y selenio, mientras que la orina y heces contribuyen en un grado menor. Los bajos índices de excreción de ambos elementos cuando están presentes conjuntamente puede deberse a la competición entre ellos por los mismos transportadores<sup>71</sup>. El hecho de que ambos presentan una elevada afinidad por los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos induce a pensar en la idea de competición de los transportadores de proteínas, al igual que por otros puntos de unión.

### 3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS MERCURIO-SELENIO

La administración simultánea de cloruro mercúrico y selenito sódico a ratas provoca una alteración radical de las proteínas presentes en el plasma que se enlazan al mercurio y al selenio si se compara con las observadas cuando cada elemento es administrado individualmente. Además, ambos elementos se han detectado en el plasma en concentraciones muy elevadas debido a su unión a una única proteína del plasma, permaneciendo próxima a la unidad la relación molar Hg:Se, independientemente de las dosis empleadas. Estudios relacionados con la interacción del selenito y mercurio inorgánico en la sangre de conejo han demostrado que el selenito se reduce en los glóbulos rojos y es transportado al plasma en forma de seleniuro<sup>72,73,74</sup>, donde reacciona con el cloruro de mercurio para formar un complejo equimolar Hg-Se que se enlaza a una proteína plasmática específica para formar el complejo Hg-Se-plasma<sup>75</sup> (Figura 5). Esta proteína específica ha sido identificada como la selenoproteína P<sup>76,77</sup>. Yoneda y col.<sup>75,76</sup> concluyeron que estos complejos contienen aproximadamente 100 átomos de mercurio y selenio. Estos resultados coinciden con los observados en un estudio llevado a cabo por Gailer y col.<sup>78</sup>. La especie de detoxificación Hg-Se-S presente en el plasma como consecuencia de la interacción del mercurio y selenio administrados a conejos fue considerada idéntica a la especie Hg-Se-S sintetizada a partir del mercurio inorgánico, selenito y glutatona (GSH) tamponada. Por ello, se cree que la GPx juega un papel esencial en este proceso de detoxificación.

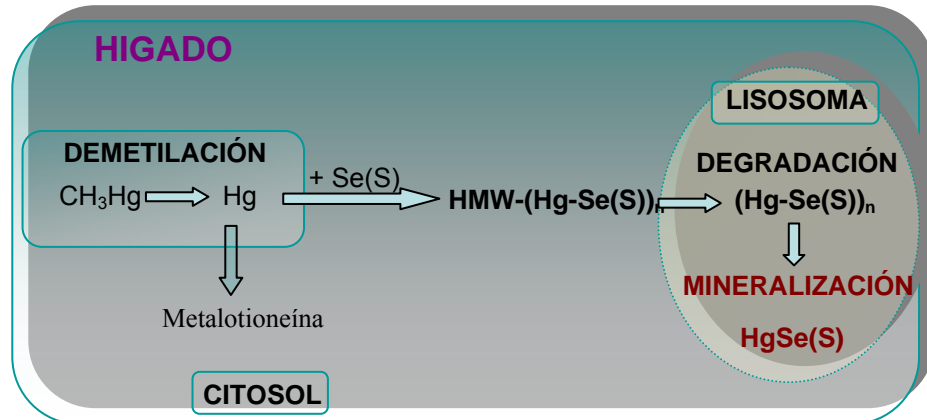
El complejo mercurio-selenio-proteína podría desempeñar un papel importante en la prevención de la toxicidad aguda ocasionada por el mercurio inorgánico mediante su unión al mercurio, y así, previniendo que alcanzase ciertos tejidos diana<sup>79</sup>.



**Figura 5.** Esquema del posible mecanismo de formación del complejo Hg-Se-Selenoproteína P

A parte del complejo mencionado hay evidencias de que el mercurio inorgánico se une a metabolitos o forma un complejo equimolecular Hg-Se que se une a especies de elevado peso molecular en el hígado<sup>80</sup>. Galier y col. asumen que las moléculas de glutatona (GSH) se unen al HgSe para hacerlo soluble, y así el complejo resultante se une a una proteína específica. Este complejo Hg-Se podría ser el precursor del HgSe cristalino puesto que se ha comprobado que la hidrólisis enzimática de estos complejos mediante proteasa conduce a la obtención de mercurio y de selenio insoluble. Ikemoto y col.<sup>81</sup> asumieron que la degradación de las proteínas unidas al complejo Hg-Se en los lisosomas, en los cuales se conoce la proteólisis intracelular, puede conducir a la formación del HgSe cristalino a partir del complejo Hg-Se-proteína (Figura 6). Esta suposición es avalada por el hecho de que el HgSe se encuentra fundamentalmente presente en los lisosomas.

Este compuesto tiene una menor solubilidad que sus análogos seleniuros metálicos o sulfuro mercúrico y es almacenado en los riñones e hígados de distintos animales (mamíferos marinos y aves<sup>82</sup>) en forma de partículas densas. El análisis de estos complejos por espectroscopia de rayos-X y otras técnicas ha revelado ser tiemanita<sup>83</sup>, siendo su cristalización el último paso de un proceso de detoxificación. Este principio podría explicar también la consistente relación molar 1:1 encontrada entre el mercurio y selenio en organismos tales como focas y otros mamíferos marinos<sup>5,6</sup>. Claramente, los pescados difieren de los mamíferos marinos en este aspecto.



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de detoxificación que tiene lugar en el hígado de animales marinos situados en lo alto de la cadena trófica<sup>81</sup>

La presencia del mercurio hace que el selenio liberado durante la degradación de las selenoproteínas se le pueda unir, reduciendo así la biodisponibilidad del selenio para la síntesis de proteínas.

Los mamíferos marinos están muy expuestos a la toxicidad del metilmercurio debido a su elevado consumo de pescados. Los procesos involucrados para la detoxificación son fundamentalmente la eliminación del metilmercurio y/o biotransformación y bioacumulación de productos no tóxicos. El metilmercurio sufre un proceso de demetilación y puede experimentar los mismos mecanismos mencionados anteriormente para el mercurio inorgánico, según muestra la figura 6. Además, existen evidencias de que el metilmercurio como tal forma un complejo inestable mercurio-selenio con una relación molar de mercurio:selenio de 2:1<sup>84</sup>.

Estudios llevados a cabo por Sumino demostraron que el metilmercurio enlazado a las proteínas de la sangre del conejo se convertía *in vitro* en metilmercurio libre y soluble en benceno mediante la adición de selenito bajo condiciones fisiológicas. Estudios posteriores muestran que cuando el cloruro de metilmercurio y el selenito sódico son añadidos a la sangre de conejo, la extracción con benceno muestra una relación molar 2:1 de mercurio-selenio. Otros estudios ponen de manifiesto que ambos elementos forman un único compuesto identificado como seleniuro bis (metilmercúrico) (SBM),  $(\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{Se}$ <sup>49,85</sup>.

Se ha estudiado la participación de la glutatona (GSH) en la formación de este compuesto y se piensa que la glutatona reduce al selenito sódico químicamente. Resultados procedentes de la adición de glutatona a cloruro de metilmercurio y selenito sódico en sangre sugieren que la glutatona media en la producción del seleniuro bis (metilmercúrico) en la sangre.





El mecanismo exacto por el cual la glutatona media la formación de este producto todavía no está muy claro. Se cree, sin embargo, que ejerce un papel muy importante en el efecto protector del selenio frente a la toxicidad del metilmercurio.

Estudios con varios compuestos de selenio ensayados *in vitro* con metilmercurio demostraron que el seleniuro sólo era capaz de formar el SBM, por lo tanto, la formación de este compuesto se verá supeditada por la conversión previa del selenito en seleniuro. La caracterización del SBM reveló que el complejo era inestable y se degradaba rápidamente en estudios *in vitro* en sangre de ratón. Además, el SBM se detectó en cantidades insignificantes en los tejidos inyectados con MeHg y selenio<sup>86</sup>. Se sugirió que el ciclo de formación y descomposición del SBM puede ocurrir repetidamente *in vivo*. Sin embargo, un estudio de la interacción de ambos elementos en ratas indicó que el selenito altera la distribución del MeHg debido a la formación de este complejo. En particular, el nivel de SBM en sangre se incrementó, siendo dicho aumento mayor 30 minutos después de la inyección de selenito<sup>87</sup>. Aunque la formación de este complejo se ha sugerido en varios tejidos, las propiedades hasta ahora elucidadas no pueden explicar completamente la habilidad del selenio para disminuir la toxicidad del metilmercurio.

Parece que los procesos involucrados en la formación del complejo mercurio-selenio-proteína y seleniuro bis (metilmercúrico) en la sangre difieren notablemente, aunque ambos sugieren la participación de la glutatona. De hecho, la formación de ambos complejos conduce a dos relaciones molares diferentes entre el mercurio y el selenio. Además, hay dos formas de mercurio involucradas en la formación de estos complejos, aunque existe una posibilidad de que el cloruro de metilmercurio pueda también formar el complejo mercurio-selenio-proteína establecido por Burk y colaboradores. Sin embargo, es cierto que el mercurio inorgánico ha de someterse primero a un proceso de metilación para poder formar el seleniuro bis (metilmercúrico). En la actualidad se desconoce si los procesos de formación de ambos complejos se llevan a cabo simultáneamente o son mutuamente excluyentes.

### 3.4. CONVERSIÓN DE LAS FORMAS TÓXICAS DE MERCURIO EN OTRAS FORMAS MENOS TÓXICAS

La transformación del metilmercurio a formas menos tóxicas puede ser uno de los posibles mecanismos de detoxificación. Norseth y Clarkson<sup>88</sup> observaron que una pequeña cantidad de metilmercurio podía transformarse en mercurio inorgánico. Esta forma presenta una menor toxicidad y tiene una menor vida media biológica<sup>89</sup>. Aunque el mecanismo exacto de demetilación no está claro, se ha sugerido que los radicales oxígeno pueden jugar un papel muy importante en este proceso<sup>90</sup>.

En mamíferos y aves marinas el mercurio procedente de la dieta se encuentra fundamentalmente en forma de metilmercurio, y este es biotransformado lentamente a mercurio inorgánico dentro de sus organismos y acumulado principalmente en la fracción nuclear, lisosomal y mitocondrial de sus células. Por ello, una fracción elevada del mercurio acumulado en el hígado (órgano diana) se encuentra en forma de Hg(II). El mercurio inorgánico así formado se puede unir a metalotioneínas o formar los complejos equimoleculares comentados anteriormente.

Numerosos grupos de investigación<sup>36,91,92,93,94,95</sup> han sugerido que la conversión del metilmercurio a mercurio inorgánico se ve favorecida por la presencia de selenio. Esta hipótesis fue reforzada por los niveles tóxicos de mercurio y selenio encontrados en animales que no mostraban ningún síntoma de contaminación por mercurio o selenio.

Algunos estudios revelan que en el cerebro y el hígado<sup>96</sup> de ratas la demetilación del metilmercurio se veía favorecida por la presencia de selenito sódico. En cerebros de monos alimentados crónicamente con metilmercurio se detectaron elevadas concentraciones de mercurio inorgánico, siendo presumiblemente el resultado de un proceso de demetilación<sup>97</sup>. Además, se observó una correlación positiva entre los niveles de mercurio inorgánico y de selenio y una correlación negativa entre el mercurio orgánico y el selenio. Esto sugirió la formación de un complejo  $Hg_{inorgánico}-Se$  en el cerebro como resultado de un proceso de detoxificación.

Urano y col.<sup>98</sup> observaron que el metilmercurio suprime la secreción biliar del selenio exógeno (administrado como selenito sódico), mientras que aumenta la exhalación de compuestos metilados de selenio. La S-adenil metionina, donante del grupo metilo empleado para metilar al seleniuro y transformarlo así en la forma volátil, se requiere en bajas concentraciones cuando se administra simultáneamente selenito sódico y metilmercurio, con respecto a un tratamiento exclusivo de selenito sódico. Aunque el mecanismo involucrado es desconocido, los autores sugieren que el metilmercurio puede actuar como donante del grupo metilo, reduciendo la concentración de S-adenil metionina requerida para la metilación del selenio, resultando así en la demetilación del metilmercurio por el seleniuro<sup>99</sup>.

Esta tesis se ve avalada por los experimentos de Yamane y col.<sup>100</sup> quienes observaron que la co-administración de selenio y metilmercurio (marcado isotópicamente con <sup>14</sup>C) producía un aumento (entre 5 y 7 veces superior) en la exhalación del <sup>14</sup>C en forma de CH<sub>3</sub>SeCH<sub>3</sub> y no en forma de CO<sub>2</sub>, lo que pone de manifiesto la ruptura del enlace carbono-mercurio y la metilación del selenio.

Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que el seleniuro favorece la demetilación del metilmercurio en presencia de un exceso de GSH, lo que permite la formación del H<sub>2</sub>Se<sup>101</sup>. Sin embargo, otros estudios concluyen lo contrario<sup>102,103</sup>. Por ejemplo, los descritos por Sheline y Schmidt-Nielsen, quienes consideraron como indicador de la demetilación la determinación de la ruptura del enlace carbono-mercurio. Emplearon <sup>14</sup>C y <sup>203</sup>Hg para marcar el metilmercurio y determinar así la distribución de ambos isótopos en los tejidos del pez *Fundulus heteroclitus*. Los resultados no mostraron ninguna diferencia en la distribución de estos isótopos, lo que llevó a la conclusión de que no se producía la ruptura del enlace carbono-mercurio.

### 3.5. PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO

El selenio es un componente intrínseco de la glutatióna peroxidasa y el mercurio es conocido por inhibir la actividad de esta enzima<sup>104</sup>. Esto podría explicar en parte el efecto dañino producido por el mercurio, particularmente en el hígado y el tejido nervioso. La glutatióna peroxidasa es incapaz de proteger estos tejidos de los cambios oxidativos inducidos por el mercurio. Ganther<sup>105</sup> propuso una posible implicación de los radicales libres formados por la ruptura homolítica del metilmercurio en la inducción de los efectos neurotóxicos. El metilmercurio sería absorbido por las membranas de los tejidos diana, tales como el cerebro, próximos a los lípidos y después se iniciaría una cadena de reacciones de peroxidación de varios constituyentes lipídicos como resultado de la tendencia del metilmercurio a sufrir una fisión homolítica. Sin el tratamiento de selenio, el metilmercurio inhibiría la actividad de la glutatióna peroxidasa, haciendo imposible la descomposición de los peróxidos que iniciarían la ruptura del metilmercurio en los radicales libres metil y mercurio, y consecuentemente dañarían los tejidos. El tratamiento con selenio podría paliar totalmente el efecto inhibitorio del metilmercurio sobre la glutatióna peroxidasa, como muestran Chang y Suber<sup>106</sup>, asegurando la integridad de los componentes biológicos de las células y tejidos vía antioxidación. Esto explicaría también los efectos protectores de la vitamina E, un agente antioxidante, frente a la toxicidad del metilmercurio.

Otros investigadores no han observado evidencias de la ruptura del enlace C-Hg en un gran número de tejidos, pero esto no necesariamente niega la hipótesis de Ganther

del radical libre. Incluso si hubiera una fisión homolítica del metilmercurio a los radicales libres metil y mercurio, tales radicales no tendrían tiempo para redistribuirse independientemente en otros tejidos. Debido a su naturaleza inestable, interaccionarían inmediatamente con otras moléculas, por ejemplo con lípidos y otros compuesto y se enlazarían eventualmente a ellos.

A pesar de que se han postulado distintos mecanismos para explicar las distintas interacciones no se conocen completamente los procesos implicados. Por lo tanto, se aboga por un mayor esfuerzo desde la comunidad científica con el fin de alcanzar un conocimiento más exhaustivo de todos los fenómenos involucrados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Parizek J., Ostadalova I., *Experientia*, 1967, 23, 142.
- <sup>2</sup> Watanabe C., *Tohoku J. Exp. Med.*, 2002, 196, 71.
- <sup>3</sup> Ganther H., Goudie C., Sunde M., Kopecky M., Wagner S., Hoekstra W., *Science*, 1972, 175, 1122.
- <sup>4</sup> Cuvin-Aralar M.A.A., Funness R., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1991, 21, 348.
- <sup>5</sup> Koeman J.H., Peeters W., Koudstaal-Hol C., Tijoe P.S., De Goeij J.J.M., *Nature*, 1973, 245, 285.
- <sup>6</sup> Koeman J.H., Van de Ven W.S., De Goeij J.J.M., Tijoe P.S., Van Haften J.L., *Sci. Total Environ.*, 1975, 3, 279.
- <sup>7</sup> Ping L., Nawasaka H., Matsumoto K., Suzuki A., Fuwa K., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1986, 11, 185.
- <sup>8</sup> Nielsen C.O., Dietz R., *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1990, 24, 61.
- <sup>9</sup> Skaare J.U., Degre E., Aspholm P.E., Ugland K.I., *Environ. Pollut.*, 1994, 85, 153.
- <sup>10</sup> Storelli M.M., Ceci E., Marcotrigiano G.O., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1998, 61, 541.
- <sup>11</sup> Storelli M.M., Marcotrigiano G.O., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2002, 69, 516.
- <sup>12</sup> Kosta L., Byrne A.R., Zelenko V., *Nature*, 1975, 254, 238.
- <sup>13</sup> Drash G., Wanghofer E., Roider G., Stobach S., *J. Trace Elements Med. Biol.*, 1996, 10, 251.
- <sup>14</sup> Wagemann R., Muri D.C.G., *Can. Field Nat.*, 1984, 86, 123.
- <sup>15</sup> Heinz G.H., Hoffman D.J., *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, 17, 2, 139.
- <sup>16</sup> Ganther H.E., Sunde M.S., *J. Food Sci.*, 1974, 39, 1.
- <sup>17</sup> Kai N., Ueda T., Dataoka A., *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, 1983, 31, 69.
- <sup>18</sup> Kai N., Ueda T., Takeda M., Dataoka A., *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 1986, 52, 553.
- <sup>19</sup> Freeman H.C., Shum G., Uthe J.F., *J. Environ. Sci. Health A*, 1978, 13, 235.
- <sup>20</sup> Luten J.B., Ruitter A., Ritskes T.M., Rauchbaar A.B., Riekwel-Booy G., *J. Food Sci.*, 1980, 45, 416.
- <sup>21</sup> Dietz R., Riget F., Born E.W., *Sci. Total Environ.*, 2000, 245, 15.
- <sup>22</sup> Friedman M.A., Eaton L.R., Carter W.H., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1978, 19, 463.
- <sup>23</sup> Potter S., Matrone G., *J. Nutr.*, 1974, 104, 638.
- <sup>24</sup> Stillings B., Lagally G., Bauersfeld P., Soares J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1974, 30, 243.
- <sup>25</sup> Burk R.F., Jordan F.E., Kiker K.W., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1977, 40, 71.
- <sup>26</sup> Kim J.H., Birks E., Heisinger JF., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1977, 17, 132.
- <sup>27</sup> Cuvin M.L.A., Furness R.W., *Aquat. Toxicol.*, 1988, 13, 205.
- <sup>28</sup> Micalleff S., Tyler P.A., *Mar. Pollut. Bull.*, 1987, 18, 180.
- <sup>29</sup> Nuutinen S., Kukkonen J.V.K., *Biogeochemistry*, 1998, 40, 267.

- <sup>30</sup> Hill C.H., *J. Nutr.*, 1974, 104, 593.
- <sup>31</sup> Kasuya M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1976, 23, 136.
- <sup>32</sup> Turner M.A., Rudd J.W.M., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1983, 40, 2241.
- <sup>33</sup> Paulsson K., Lindbergh K., *Sci. Total Environ.*, 1989, 87-88, 495.
- <sup>34</sup> Rudd J.W.M., Turner M.A., Townsend B.E., Swick A., Furutani A., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1980, 40, 848.
- <sup>35</sup> Turner M.A., Swick A.L., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1983, 40, 2241.
- <sup>36</sup> Ohi G., Nishigaki S., Seki H., Tamura Y., Maki T., Konno H., Ochiai S., Yamada H., Shimamura Y., Mizoguchi I., Yagyu H., *Environ. Res.*, 1976, 12, 49.
- <sup>37</sup> Fang S.C., *Chem. Biol. Interact.*, 1977, 17, 25.
- <sup>38</sup> Wang W-X., Wong R.S.K., Wang J., Yen Y-F., *Aquatic Toxicol.*, 2004, 68, 39.
- <sup>39</sup> Sharma D.C., Davis P.S., *Indian J. Exp. Bio.*, 1980b, 18, 69.
- <sup>40</sup> Magos L., Clarkson T.W., Hudson A.R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1984, 228, 478.
- <sup>41</sup> Magos L., Clarkson T.W., Sparrow S., Hudson A.R., *Arch. Toxicol.*, 1987, 60, 422.
- <sup>42</sup> Matsumoto H., Miki Y., *Eisei Kagaku*, 1981, 27, 348.
- <sup>43</sup> Pelletier E., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1986, 43, 203.
- <sup>44</sup> Mykkänen H.M., Metsäniitty L., *J. Nutr.*, 1987, 117, 1453.
- <sup>45</sup> El Begearmi M.M., Ganter H.E., Sunde M.L., *Poultry Sci.*, 1982, 61, 272.
- <sup>46</sup> Chen R.W., Whanger P.D., Fang S.C., *Pharmacol. Res. Commun.*, 1974, 6, 571.
- <sup>47</sup> Cuvin-Aralar M.L.A., Furness R.W., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, 45, 775.
- <sup>48</sup> Sheline J., Schimdt-Nielsen B., *Physiological Responses of Marine Biota to Pollutants: Methylmercury-selenium Interaction in killifish, Fundulus heteroclitus*, 1975, pp 119-130. Vernberg F. (Ed). Symposium, Milford, CN.
- <sup>49</sup> Imura N., Naganuma A., *Advances in Mercury Toxicology*, 1991, pp 275-288. Suzuki T. (Ed). Plenum press, Nueva York.
- <sup>50</sup> Hansen J.C., Kristensen P., Al-Masri S.N., *Nord. Vet. Med.*, 1981, 33, 57.
- <sup>51</sup> Groth D.H., Vignati L., Lowry L., Mackay G., Stokinger H.E., *Mutual antagonistic and synergistic effects of inorganic selenium and mercury salts in chronic experiments*, 1972. Proceedings of the 6<sup>th</sup> Annual conference on Trace Substances in Environmental Health. University of Missouri, Columbia, Missouri, EEUU.
- <sup>52</sup> Komsta-Szumaska E., Chmielnicka J., *Arch. Toxicol.*, 1977, 38, 217.
- <sup>53</sup> Cikrt M., Bencko V., *Toxicol. Letters*, 1989, 48, 159.
- <sup>54</sup> Chmielnicka J., Brzeznicza E., Sniady A., *Arch. Toxicol.*, 1986, 59, 16.
- <sup>55</sup> Seppänen K., Laatikaine R., Salonen J.T., Kantola M., Lötjönen S., Harri M., Nurminen L., Kaikkonen J., Nyysönen K., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1998, 65, 197.
- <sup>56</sup> Johnson S., Pond W.G., *Nutr. Rep. Int.*, 1974, 9, 135.
- <sup>57</sup> Glynn A.W., Lind Y., *Pharmacol. Toxicol.*, 1995, 77, 41.
- <sup>58</sup> Stoewsand G.S., Bache C.A., Lisk D.J., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1974, 11, 152.

- <sup>59</sup> Ansari M.S., Britton W.M., *Poultry Sci.*, 1974, 53, 1134.
- <sup>60</sup> El-Begearmi M.M., Sunde M.L., Ganther H.E., *Poultry Sci.*, 1977, 56, 313.
- <sup>61</sup> Sell J.L., Horani F.G., *Nutrition Reports International*, 1976, 14(4), 439.
- <sup>62</sup> Emerick R.J., Palmer I.S., Carlson C.W., Nelson R.A., *Fed. Proc.*, 1976, 35, 577.
- <sup>63</sup> Welsh S.O., Soares J.H., *Fed. Proc.*, 1974, 33, 660.
- <sup>64</sup> Kosutzka E., Pribilincova J., Ledec M., Maretta M., *Acta Veterinaria (Beograd)*, 2002, 52:5-6, 355.
- <sup>65</sup> Naganuma A., Hirabayashi A., Imur N., *Eisei Kagaku*, 1981, 27, 64.
- <sup>66</sup> Komsta-Szumaska E., Chmielnicka J., *Clin. Toxicol.*, 1981, 18, 1327.
- <sup>67</sup> Moffitt A.E.J., Clary J.J., *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1974, 7, 593.
- <sup>68</sup> Winge D.R., Premakumar R., Rajagopalan K.V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, 170, 242.
- <sup>69</sup> Sumino K., Yamamoto R., Kitamura S., *Nature*, 1977, 268, 73.
- <sup>70</sup> Leonzio C., Focardi S., Bacci E., *Sci. Total. Environ.*, 1982, 24, 249.
- <sup>71</sup> Lucu C., Skreblin M., *Mar. Environ. Res.*, 1981, 5, 265.
- <sup>72</sup> Suzuki K.T., Itoh M., *J. Chrom. B*, 1997, 692, 15.
- <sup>73</sup> Suzuki K.T., Shiobara Y., Itoh M., Ohmichi M., *Analyst*, 1998, 123, 63.
- <sup>74</sup> Shiobara Y., Suzuki K.T., *J. Chrom. B*, 1998, 710, 49.
- <sup>75</sup> Yoneda S., Suzuki K.T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, 143, 274.
- <sup>76</sup> Yoneda S., Suzuki K.T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 231, 7.
- <sup>77</sup> Sasakura C., Suzuki K.T., *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 71, 159.
- <sup>78</sup> Gailer J., George G., Pickering I.J., Madden S., Prince R.C., Yu E.Y., Denton M.B., Younis H.S., Aposhian H.V., *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13, 1135.
- <sup>79</sup> Burk R.F., Foster K.A., Greenfield P.M., Kiker K.W., *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1974, 145, 782.
- <sup>80</sup> Ikemoto T., Kunito T., Anan Y., Tanaka H., Baba N., Miyazaki N., *Environ. Toxicol. Chem.*, 2004, 23, 2008.
- <sup>81</sup> Ikemoto T., Kunito T., Tanaka H., Baba N., Miyazaki N., Tanabe S., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2004, 47, 402.
- <sup>82</sup> Nigro M., Leonzio C., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996, 135, 137.
- <sup>83</sup> Martoja R., Berry J.P., *Vie Milieu*, 1980, 30(1), 7.
- <sup>84</sup> Magos L., Webb M., Hudson A.R., *Chem. Biol. Interact.*, 1979, 28, 359.
- <sup>85</sup> Naganuma A., Imura N., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1980, 27, 163.
- <sup>86</sup> Naganuma A., Kojima Y., Imura N., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1980, 30, 3159.
- <sup>87</sup> Masukawa T., Kito H., Hayashi M., Iwata H., *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31, 75.
- <sup>88</sup> Norseth T., Clarkson T.W., *Arch. Environ. Health*, 1970, 21, 717.
- <sup>89</sup> Norseth T., Clarkson T.W., *Arch. Environ. Health*, 1971, 22, 568.

- <sup>90</sup> Hirayama K., Yasutake A., *Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan: In vivo degradation of methylmercury-its mechanism and significance in methylmercury-induced neurotoxicity*, 2001, pp. 103-110. Takizawa Y. (Ed). Japan Public Health Assoc, Tokyo.
- <sup>91</sup> Itano K., Hawai S., Miyazaki N., Tatsukawa R., Fujiyama T., *Agric. Biol. Chem.*, 1984, 48, 1109.
- <sup>92</sup> Thompson D.R., *Heavy metals in the marine environment: Metal levels in marine vertebrates*, 1990, pp 143-182. Furness R.W., Rainbows P.S. (Ed). CRC, Boca Raton, Florida, EEUU.
- <sup>93</sup> Law R.J., *Environmental contaminants in wildlife, Interpreting tissue concentrations: Metals in marine mammals*, 1996, pp 357-376. Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (Eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU.
- <sup>94</sup> Yang J., Kunito T., Tanabe S., Miyazaki N., *Fish. Sci.*, 2002, 68(1), 256.
- <sup>95</sup> Nishigaki S., Tamura Y., Maki T., Yamada H., Shimomura Y., Ochiai S., Kimura Y., *Tokio Metr. Res. Lab. Pab Health*, 1974, 25, 235.
- <sup>96</sup> Brzeznicza E.A., Chmielnicka J., *Environ. Health Perspect.*, 1985, 60, 423.
- <sup>97</sup> Björkman L., Mottet K., Nylander M., Vahter M., Lind B., Friberg L., *Arch. Toxicol.*, 1995, 69, 228.
- <sup>98</sup> Urano T., Imura N., Naganuma A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 239, 862
- <sup>99</sup> Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky I., Pintér Z., *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 2001, 174, 177.
- <sup>100</sup> Yamane Y., Fukino H., Aida Y., Imagawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, 1977, 25, 2831.
- <sup>101</sup> Iwata H., Masukawa T., Kito H., Hayashi M., *Biochem. Pharmacol.*, 1981, 30, 3159.
- <sup>102</sup> Komsta-Szumaska E., Reuhal K.R., Miller D.R., *J. Toxicol. Environ. Health*, 1983, 12, 775.
- <sup>103</sup> Glynn A.W., Ilback N.G., Brabencova D., Carlsson L., Enqvist E.E., Netzel E., Oskarsson A., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1993, 39, 91.
- <sup>104</sup> Hirota Y., Yamaguchi S., Shimojoh N., Sano K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1980, 3, 174.
- <sup>105</sup> Ganther H.E., *Environ. Health Perspect.*, 1978, 25, 71.
- <sup>106</sup> Chang L.W., Suber R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1982, 29, 285.



- 
1. **TRATAMIENTO DE MUESTRA**
  2. **EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO**
    - 2.1. **EXTRACCIÓN ÁCIDA**
    - 2.2. **EXTRACCIÓN ALCALINA**
    - 2.3. **DESTILACIÓN**
    - 2.4. **EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO**
    - 2.5. **EXTRACCIÓN-PRECONCENTRACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO**
  3. **DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO**
    - 3.1. **TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**
    - 3.2. **TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS**
  4. **EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE SELENIO**
    - 4.1. **EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES**
    - 4.2. **HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS**
  5. **DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO**
    - 5.1. **TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**
    - 5.2. **TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS**
  6. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- 

**TRATAMIENTO DE MUESTRA Y TÉCNICAS ANALÍTICAS  
PARA LA ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO  
EN MUESTRAS DE INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL**

Capítulo IV

## **TRATAMIENTO DE MUESTRA Y TECNICAS ANALÍTICAS PARA LA ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO EN MUESTRAS DE INTERÉS BIOLÓGICO Y MEDIOAMBIENTAL**

En la actualidad el mercurio y el selenio se encuentran en muy baja concentración en el medio ambiente y en los sistemas biológicos, por lo que es necesario disponer de técnicas de elevada sensibilidad para proceder a su determinación. La mayor parte de estas técnicas analíticas requieren un tratamiento de muestra más o menos complejo en función del analito, su nivel de concentración, el estado físico de la muestra y sobre todo, si el objetivo final es la determinación de especies.

Aunque la determinación del contenido total de mercurio y selenio y sus especies en matrices biológicas y medioambientales de forma exacta y precisa puede resultar realmente complicada, el problema principal está estrechamente vinculado a las etapas de preparación de muestra.

### **1. TRATAMIENTO DE MUESTRA**

El tratamiento de muestra es frecuentemente la etapa más larga, laboriosa y crítica para la detección y cuantificación de elementos metálicos a nivel de trazas<sup>1</sup>. Además, estos procesos deben ser reproducibles y eficaces, siendo necesario evitar errores por pérdidas y contaminaciones procedentes de los reactivos y materiales empleados<sup>2,3,4</sup>. En todo momento debe asegurarse la integridad tanto de la forma química como de la concentración de la especie buscada.

Las matrices en las que se han de determinar estos analitos pueden tener características muy diferentes, siendo necesario en primer lugar establecer metodologías de muestreo y conservación de las muestras para después aplicar métodos de extracción de las especies presentes.

Existen distintos factores que pueden ocasionar pérdidas, contaminación o transformación de las especies durante los procesos de toma y almacenamiento de la muestra. Las fuentes de error en la etapa de muestreo pueden ser importantes como consecuencia de las bajas concentraciones en que se encuentra el mercurio y el selenio en el medio ambiente. Por otro lado, durante el almacenamiento de la muestra se pueden alterar la concentración y la forma original del analito como consecuencia de interacciones químicas entre especies o con el material del recipiente, la acción microbiana, la temperatura, el pH, la luz, etc<sup>5,6,7</sup>, por lo que en muchos casos lo más probable es que sea necesario añadir agentes conservantes para prevenir la degradación de las especies antes del análisis.

Por lo tanto, las muestras de origen biológico y medioambiental requieren el análisis inmediato o el almacenamiento a bajas temperaturas, con el fin de evitar su degradación por actividad enzimática o por procesos naturales de proteólisis y autólisis<sup>8</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos procesos llevados a cabo para mejorar la homogeneidad y el almacenamiento de las muestras como es el caso de la liofilización, pueden constituir un riesgo en muestras biológicas debido a la posibilidad de pérdidas de volátiles, así como a la degradación de proteínas asociadas a metales.

La mayoría de las técnicas analíticas instrumentales empleadas para la determinación de contenidos totales requiere la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra. Generalmente, el análisis de muestras biológicas y de tipo medioambiental se lleva a cabo mediante procesos de mineralización por vía húmeda.

En la digestión por vía húmeda es frecuente la adición de uno o más reactivos, generalmente ácidos, con propiedades complementarias (ácido-base, redox y/o complejantes) que mejoran el proceso de mineralización. La digestión se acompaña con un calentamiento en placa calefactora o en horno (200-300°C), bien en recipientes cerrados o abiertos. En los recipientes cerrados se alcanzan no sólo altas temperaturas sino también elevadas presiones que contribuyen a la destrucción de la materia orgánica. La digestión en abierto sólo es adecuada cuando el analito a determinar no forma especies volátiles, por lo tanto para la determinación de mercurio y de compuestos volátiles de selenio se recomienda realizar la mineralización por vía húmeda en recipientes cerrados.

En los últimos años, se ha extendido el empleo de hornos microondas como sistemas de calentamiento, por las mejoras que suponen en cuanto a la reducción del tiempo de mineralización, la cantidad de reactivos, eficiencia y reproducibilidad. La digestión puede llevarse a cabo con  $\text{HNO}_3$ <sup>9</sup>,  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ <sup>10,11,12</sup>,  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ <sup>13,14</sup> o con mezclas del  $\text{HNO}_3$  con otros ácidos<sup>15</sup>. El horno de microondas es por tanto, un dispositivo muy adecuado para el análisis de compuestos volátiles.

Actualmente el desarrollo de tratamientos de muestra alternativos es un área de gran interés que se encuentra en continuo desarrollo. A veces la disolución de la matriz no está totalmente justificada y con tratamientos menos vigorosos se consigue extraer el analito de la matriz. Uno de estos procedimientos se basa en la extracción del analito de la matriz sólida mediante el empleo de disolventes. En estos procesos el objetivo es extraer el metal de la matriz orgánica sin que se produzca su descomposición. Los procedimientos de extracción por medio de ácidos diluidos son el modo más extendido para el pretratamiento de muestras biológicas en la determinación de metales. Bajo condiciones de trabajo moderadas, la energía de microondas también puede aplicarse a la extracción cuantitativa de metales, aunque, típicamente es la energía ultrasónica la que se emplea para la extracción del analito. Esta técnica tiene como ventaja la reducción de posibles interferencias.

El ultrasonidos tiene numerosas aplicaciones en el campo de la química<sup>16,17</sup>. Entre algunas de sus características, facilita la lixiviación de los metales en matrices sólidas, mejorando la disgregación de los sólidos y aumentan la eficacia de la extracción.

Dentro de los generadores de ultrasonidos, los dispositivos más comúnmente empleados son el baño y la sonda de ultrasonidos. En los dispositivos tipo sonda, la transmisión de la energía acústica al medio de reacción es directa, ya que la sonda se introduce físicamente en el medio de trabajo. Su diseño instrumental permite amplificar la potencia, de forma que la energía que transmite puede llegar a ser del orden de 100 veces superior a la obtenida con el baño.

Desgraciadamente, el contenido total de un determinado elemento en una muestra no proporciona la información necesaria para evaluar el papel biológico que desempeña, su toxicidad o su biodisponibilidad. De hecho, para explicar la actividad biológica (biodisponibilidad, funcionalidad, toxicidad, etc.) de los elementos en el medioambiente y/o seres vivos es imprescindible la identificación y cuantificación de las especies presentes, es decir, es necesario llevar a cabo estudios de especiación<sup>18,19,20</sup>.

El creciente interés por la especiación elemental ha impulsado el desarrollo de una nueva generación de métodos analíticos suficientemente sensibles y selectivos para permitir la identificación, caracterización y determinación de las distintas formas físico-químicas de mercurio y selenio en matrices complejas. Estos métodos deben incluir el menor número de etapas posibles para evitar contaminación, pérdidas y modificaciones de los equilibrios entre las especies presentes<sup>21</sup>.

## 2. EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO

La extracción de las especies de mercurio es la etapa crucial de todo el proceso analítico siendo particularmente conflictiva en muestras sólidas ya que las especies deben extraerse cuantitativamente preservando en todo momento su forma química. Las técnicas de extracción más empleadas en la especiación del mercurio presente en muestras biológicas y medioambientales se pueden dividir en cuatro grandes grupos:

### 2.1. Extracción ácida

Es con diferencia la opción más utilizada para extraer las especies de mercurio. Hacia finales de los años 60, Westöð desarrolló un método que permitía la extracción de metilmercurio en una gran variedad de muestras empleando HCl y benceno<sup>22,23</sup>. En este método la muestra se somete a un medio fuertemente ácido (HCl concentrado), adicionándose a continuación cloruro sódico. Esto permite la liberación del metilmercurio, pero no de la especie Hg(II) de la matriz, para ser posteriormente extraído a una fase orgánica de benceno. La acidificación de la muestra con ácidos halogenados consigue por un lado la protonación de aquellos centros activos de los componentes de la muestra (ácidos húmicos, arcillas, etc.) que retiene a las especies de mercurio por fuerza iónica. A su vez, la formación de haluros de organomercurio facilita su extracción hacia la fase orgánica de benceno<sup>24</sup>. El método de Westöð sigue siendo hoy en día uno de los más empleados, si bien se han efectuado algunas modificaciones para la extracción selectiva de metilmercurio, utilizando ácidos minerales junto con NaCl<sup>25</sup>, KBr o ácido yodo acético seguido de sucesivas extracciones con disolventes orgánicos como benceno<sup>26,27</sup>, tolueno<sup>28,29,30</sup>, cloroformo<sup>31</sup> o diclorometano<sup>32</sup>. Algunos autores recomiendan una re-extracción de las especies a fase acuosa con el fin de limpiar o preconcentrar los extractos. Westöð propuso una re-extracción mediante la conversión de las especies de mercurio a hidróxido empleando hidróxido amónico saturado con sulfato sódico, pero actualmente, los reactivos que se utilizan son cisteína o tiosulfato sódico. En el caso de la especiación de metilmercurio, también se ha propuesto el uso de cloroformo junto con agentes complejantes para facilitar su extracción y la adición de HgCl<sub>2</sub> o CuCl<sub>2</sub> para favorecer la liberación del MeHg<sup>+</sup> unido a grupos -SH en muestras sólidas<sup>33</sup>.

En los últimos años se ha extendido la utilización de las microondas como agente extractivo rápido y cómodo. La extracción generalmente se lleva a cabo en un medio ácido (HCl), si bien algunos autores se decantan por la combinación tradicional HCl:Tolueno<sup>29,34</sup> (inspirada en el método de Westöð), mientras que otros utilizan un medio ácido a partir de ácido nítrico<sup>35,36</sup> o combinando HCl y HNO<sub>3</sub><sup>37,38</sup>. En todos los casos, los tiempos de

extracción son muy cortos (entre 10 y 15 min), consiguiéndose rendimientos de extracción reproducibles y en concordancia con valores certificados.

Según se describía en las conclusiones del “*Workshop of Sources of Error in Methylmercury Determination*” (Mainz, Wiesbaden 1998)<sup>39</sup>, de entre los muchos extractantes orgánicos ensayados, el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> parece dar muy buenos resultados. Aunque no se ha demostrado experimentalmente, algunos autores sugieren la posibilidad de que el tolueno forme artificialmente metilmercurio. En este aspecto, el benceno parece ser un disolvente más adecuado, aunque debido a su toxicidad su aplicabilidad se ve restringida. Así, el futuro debe dirigirse hacia el empleo de disolventes no tóxicos (evitando por ejemplo, benceno y organo-clorados). Una evidencia de ello es el borrador de el método 3200 apuntado por la Agencia de Protección Medioambiental Americana (EPA), donde se proponen extracciones de varias especies de mercurio con mezclas de disolventes menos tóxicos<sup>40</sup>.

## 2.2. Extracción alcalina

Dentro de la extracción alcalina destacan tanto la extracción en medio básico fuerte (KOH en medio metanol<sup>41,42,43,44,45</sup>), como en medio básico débil (hidróxido de tetrametilamonio, TMAH)<sup>38,44,46,47</sup>. La extracción en medio básico encontró sus primeras aplicaciones en el análisis de especies de mercurio en pelo, sangre, peces y tejidos blandos, debido a su gran capacidad para romper los enlaces proteína-Hg o lípido-Hg<sup>48,49</sup>, aunque en la mayoría de los casos la extracción alcalina es más complicada que la ácida. Algunos autores consideran que la digestión a temperaturas superiores a la ambiente en medio básico, puede inducir también a la formación artificial de metilmercurio a partir del mercurio inorgánico presente en la muestra<sup>39,46,50</sup>. Además, da lugar a problemas en las etapas de preconcentración, separación y detección, debido a los altos niveles de materia orgánica, sulfuros e iones Fe<sup>3+</sup> co-extraídos junto con la especie de interés.

Al igual que lo que sucedía en la extracción ácida, el empleo de las microondas se ha extendido para disminuir el tiempo y aumentar el rendimiento de la extracción alcalina<sup>36,38,51,52</sup>.

## 2.3. Destilación

Esta metodología ofrece una menor versatilidad que la proporcionada por la extracción con disolventes. La mayoría de las publicaciones mencionan como únicos reactivos al agua, KCl o NaCl así como algún tipo de antiemulsionante. La temperatura de trabajo suele situarse entre los 140 y 180 °C, facilitándose normalmente la destilación

mediante una corriente de nitrógeno. Se debe adicionar una pequeña cantidad de ácido sulfúrico a la mezcla momentos antes de iniciarse la destilación.

A pesar de ser una técnica ampliamente extendida, ha sido también objeto de algunas críticas por la posible formación artificial de metilmercurio<sup>46,39,53,54</sup>. Tiempos excesivamente largos de destilación pueden facilitar la conversión abiótica del mercurio inorgánico a metilmercurio. La conversión porcentual respecto al contenido de mercurio inorgánico es muy pequeña, aunque esto puede suponer un error en la determinación de metilmercurio muy importante, pues también lo es la proporción de esta especie. La conversión parece estar facilitada por la elevada presencia de materia orgánica disuelta (DOC), de ácidos carboxílicos, ácidos húmicos o partículas con elevada área superficial, mientras que no parece estar afectada por la presencia de materia orgánica no degradada. Este problema puede ser superado reduciendo el tiempo de destilación y en consecuencia el volumen de destilado. De este modo, aunque se empeoran sensiblemente los rendimientos de extracción se evitan en gran medida los problemas de formación artificial de metilmercurio, tal y como ha quedado demostrado en la certificación del material de referencia CRM-580, donde los grupos de investigación que emplearon la destilación como técnica de extracción obtuvieron resultados análogos a otros grupos que utilizaron otras técnicas extractivas<sup>55</sup>.

Además de la formación de metilmercurio durante la etapa de extracción, las técnicas anteriores presentan otros inconvenientes, como son el elevado consumo de disolventes y el gran número de etapas necesarias para una extracción cuantitativa, con los riesgos de contaminación o pérdidas, y el largo tiempo de análisis por muestra que esto implica. Como alternativa se ha empleado la extracción asistida por ultrasonidos<sup>56</sup>, el empleo de microondas focalizados y sistemas a presión<sup>31,34</sup>. De esta forma se consigue reducir el consumo de disolventes y el tiempo de extracción, pero no se debe olvidar que estos métodos emplean condiciones de presión y temperatura más energéticas, lo cual puede dar lugar a transformaciones o a pérdidas de las especies.

#### **2.4. Extracción con fluidos supercríticos**

Esta tecnología aplicada a la extracción de compuestos de mercurio<sup>29,57,58</sup> se encuentra todavía en proceso de optimización, si bien las expectativas puestas en ella son altas. Los reactivos utilizados son baratos y nada tóxicos (principalmente dióxido de carbono), mientras que los tiempos de extracción son razonablemente cortos (alrededor de una hora). Sin embargo, los rendimientos conseguidos hasta el momento no son lo suficientemente elevados (entre el 50 y el 70%) como para ser considerada una técnica de rutina en esta aplicación concreta.

## 2.5. Extracción-preconcentración de especies de mercurio

Desgraciadamente, las bajas concentraciones de mercurio encontradas en algunas muestras biológicas y medioambientales hacen necesaria una etapa de preconcentración previa al análisis que permita alcanzar niveles de concentración detectables por la técnica analítica seleccionada. Dentro de las técnicas de preconcentración empleadas destacan la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida, pero además existen dos técnicas comúnmente utilizadas en la especiación de mercurio caracterizadas por no emplear disolventes orgánicos que permiten la extracción y preconcentración simultánea de los analitos (microextracción en fase sólida y atrapamiento criogénico).

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica que ha suscitado un gran interés como técnica de extracción aplicable a muestras en estado sólido, líquido o gaseoso. Se trata de un nuevo sistema que aúna la etapa de muestreo, aislamiento y preconcentración del analito de una forma muy sencilla, permitiendo su acoplamiento a una gran variedad de dispositivos instrumentales ya existentes. La técnica se basa en el establecimiento de un equilibrio de absorción o adsorción de los analitos deseados sobre el recubrimiento de una fibra de sílice fundida (divinil-benceno, DVB, carboxeno, CAR y polidimetilsiloxano, PDMS) siendo esta última la más utilizada. Posteriormente, los analitos retenidos en la fibra se desorben, separan y cuantifican en un detector adecuado. La SPME es compatible tanto con la cromatografía de gases como con la de líquidos. En los últimos años, y debido a su fácil acoplamiento con la cromatografía de gases, su aplicación se ha centrado en el análisis de compuestos de mercurio en muestras medioambientales<sup>59,60,61,62</sup> y biológicas<sup>45,47,63,64</sup>. Para mejorar la eficacia de la microextracción, en el caso del metilmercurio se han utilizado fibras de sílice fundida sin recubrimiento tratadas con HF durante tres horas y posteriormente acondicionadas a 200°C<sup>65</sup>.

La utilización de la SPME como sistema de aislamiento y preconcentración de analitos volátiles minimiza los tiempos de tratamiento de muestra, lo que implica un menor riesgo de pérdida de analitos de interés así como de transformaciones de las especies originales presentes en la muestra. Es, por tanto, una de las técnicas con mayor proyección en el tratamiento de muestra.

Por otra parte, el atrapamiento criogénico (CT) permite extraer y preconcentrar los derivados volátiles de los analitos mediante una etapa previa de generación de hidruro o etilación y su posterior purga con una corriente gaseosa hacia una columna con un relleno análogo al de una columna cromatográfica (p.e. dimetilpolisiloxano) sumergida en nitrógeno líquido. Posteriormente las especies son desorbidas y separadas en función de sus puntos de ebullición por calentamiento de la columna<sup>36,37,38,52,66,67</sup> o bien sólo desorbidas y separadas por una columna cromatográfica adicional situada a la salida del



atrapamiento. De esta forma, los analitos presentes en las muestras medioambientales pueden ser preconcentrados y separados sin necesidad de ningún tipo de extractante orgánico. Por lo tanto, los analitos de interés pueden ser analizados por cromatografía de gases a partir de una fase acuosa, además de haber minimizado el tiempo empleado en el tratamiento de muestra.

### 3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO

El creciente interés por la determinación de especies de mercurio durante las dos últimas décadas ha conducido al desarrollo de un gran número de métodos analíticos basados en el acoplamiento de técnicas de separación con detectores específicos, capaces de discriminar entre las diferentes formas de un elemento. Estos quedan recogidos de manera resumida en la figura 6.



**Figura 6.** Resumen de las diferentes técnicas analíticas empleadas para la determinación de especies de mercurio

### 3.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Aunque existen algunos sistemas no cromatográficos para la separación y determinación de las especies de mercurio una vez extraídas de la matriz, la mayoría de las técnicas utilizadas son cromatográficas.

#### Cromatografía de gases

Es la técnica cromatográfica más utilizada de cuantas se aplican a la especiación de mercurio desde que Westöö propusiera su método a finales de los años 60, debido a su alto poder de resolución, fácil manejo y facilidad de acoplamiento a un gran número de detectores.

Inicialmente se empleaban columnas de longitud y diámetro interno variable (15-30 m y 0.3-0.75 cm respectivamente) empaquetadas con OV 101 absorbido sobre un soporte sólido de Chromosorb W-HP<sup>49,68</sup> o columnas de vidrio silanizado empaquetadas con DEGS-PS al 5%<sup>69</sup>. Este tipo de columnas presentaba sin embargo varios problemas<sup>70</sup>, entre los que destaca la aparición de colas en los picos cromatográficos, pobre eficiencia de la columna y áreas de pico reducidos. El carácter polar del enlace Hg-haluro podría interactuar fuertemente con la columna, dando lugar a picos cromatográficos con importantes colas, incluso a aparentes reacciones de descomposición<sup>71,72</sup>. Por ello, era necesaria la pasivación de la columna, que se lleva a cabo mediante acondicionamientos con disoluciones de cloruro de mercurio, yoduro de mercurio o yoduro de metoxietilmercurio.

Con la intención de superar estos inconvenientes, se han evaluado diferentes tipos de columna capilares durante la última década utilizando tanto fases polares como fases no polares. Las separaciones se ven favorecidas empleando columnas capilares apolares, aunque se ha demostrado que el espesor de la película de recubrimiento es el factor de más peso en la eficacia de la columna<sup>73</sup>. Este tipo de columnas (mayor espesor de fase estacionaria y baja polaridad) ofrece mayor eficiencia en las separaciones y mejores resoluciones, a pesar de inyectar volúmenes de muestra pequeños (1 µl) y se han aplicado en la especiación de mercurio tanto en muestras biológicas (fundamentalmente pescados) como medioambientales (aguas, sedimentos,...)<sup>25,,64,74,75,76,77</sup>.

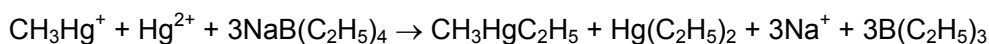
En la cromatografía de gases convencional es necesario disminuir el diámetro de la columna para mejorar la resolución pero esto implica reducir el volumen de muestra y de esta forma, la sensibilidad se ve afectada negativamente. Otra forma de mejorar la separación es aumentando la longitud de la columna, pero se incrementa el tiempo de análisis. Estas desventajas pueden ser subsanadas mediante el empleo de columnas multicapilares. Estas columnas están formadas por un conjunto de unos 1000 capilares con una longitud máxima de 1 m y entre 20-40 µm de diámetro interno, que permiten llevar

a cabo la separación en capilares finísimos y sin pérdida de sensibilidad. Esto es posible gracias a que permite inyectar volúmenes de muestra adecuados debido a que el analito se introduce en todos los capilares de forma simultánea. Para no perder resolución, es muy importante conseguir una banda estrecha del analito al principio de la columna. Debido a la corta longitud de la columna los tiempos de análisis son muy cortos. Estos capilares operan de un modo isotérmico, incluso a temperatura ambiente, evitando el uso de los voluminosos hornos de cromatografía de gases y facilitando su acoplamiento con otros sistemas.

Entre las aplicaciones más recientes destaca la separación de compuestos metilados y etilados de mercurio en muestras biológicas<sup>78</sup> bajo condiciones isotérmicas (en 45 segundos), la separación de metilmercurio y mercurio inorgánico en tejidos de pescado (en 35s) y la separación de metilmercurio, mercurio inorgánico y propilmercurio en muestras medioambientales (en 45s). También se ha aplicado a la separación de varios elementos simultáneamente: mercurio y estaño<sup>79</sup> y mercurio, estaño y plomo<sup>80</sup>.

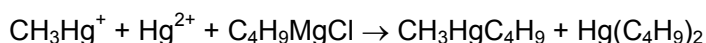
Aunque existen numerosos trabajos<sup>70,81,82,83,84</sup> en los que las especies de mercurio extraídas en un disolvente orgánico se inyectan directamente en el cromatógrafo de gases, en otras ocasiones se prefiere la derivatización previa para así aumentar su volatilidad.

De entre las posibles reacciones de derivatización, la etilación en medio acuoso con tetraetilborato sódico ( $\text{NaBEt}_4$ ) y la posterior extracción del producto de reacción en un disolvente orgánico, es uno de los procesos más aplicados en especiación de mercurio debido a su eficacia y rapidez<sup>25,33,59,85,86</sup>. La reacción que tiene lugar es:



Algunos estudios mencionan sin embargo la posible formación artificial de metilmercurio a causa de las impurezas presentes en el tetraetilborato empleado en la alquilación.

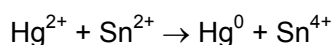
Otra reacción de derivatización muy utilizada es la butilación con un reactivo de Grignard:



Esta reacción tiene lugar en un medio orgánico aprótico por lo que las especies tienen que ser transferidas desde fase acuosa a un disolvente orgánico por lo que se alarga el proceso de preparación de las muestras.

Además, cabe destacar la derivatización de mercurio y sus especies mediante la generación de hidruros con  $\text{NaBH}_4$ <sup>65,87</sup> o  $\text{SnCl}_2$ . La generación de hidruros, comúnmente conocida como vapor frío en el caso del mercurio, está basada en la reducción del

mercurio inorgánico en mercurio elemental utilizando un agente reductor en medio ácido. En el caso del mercurio inorgánico el reductor más utilizado es el cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ):



Además del cloruro estannoso también se puede utilizar el borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente reductor:



El borohidruro sódico es también el reductor empleado para la generación del hidruro de metilmercurio ya que este analito no es reducido por el cloruro estannoso.

### DetECCIÓN

Por lo que respecta a los detectores utilizados, el acoplamiento cromatógrafo de gases-detector de captura electrónico (GC-ECD) ha sido el más empleado en el pasado<sup>28,34,88</sup>, aunque todavía está incluido en metodologías de algunos trabajos<sup>89</sup>. Debido a su baja selectividad es necesario el empleo de etapas previas de limpieza (como la propuesta por Westwöö). En la mayoría de los casos, la inyección de la muestra se hace en fase tolueno o benceno. Su principal desventaja, además del largo tiempo de análisis, es su inespecificidad.

Sin embargo, en la actualidad, la especiación de compuestos de mercurio en muestras medioambientales se basa fundamentalmente en el acoplamiento de la cromatografía de gases con detectores atómicos específicos y sensibles como: espectroscopía de absorción, emisión, fluorescencia atómica o espectrometría ICP-MS.

Algunos ejemplos de los acoplamientos más utilizados son:

■ **GC-AAS.** Este acoplamiento se lleva a cabo con una etapa previa de derivatización (vapor frío) o mediante un pirolizador (GC-pyro-AAS). La técnica del vapor frío se ha aplicado en numerosas ocasiones para detectar compuestos organomercuriales a la salida de un cromatógrafo de gases. Longbottom y Dressman<sup>90</sup> fueron pioneros en la aplicación de este acoplamiento para la determinación de organomercuriales con el que obtuvieron un límite de detección para el dimetilmercurio de 20 pg.

En el acoplamiento GC-pyro-AAS la línea de transferencia entre la salida de la columna cromatográfica y el detector es un capilar de sílice desactivada que atraviesa un pirolizador. Este pirolizador se calienta a 800°C descomponiendo así los compuestos

mercuriales presentes en el eluato en mercurio elemental que es conducido al detector mediante una corriente adicional de argón (make up)<sup>91</sup>.

El acoplamiento GC-AAS en ambas modalidades se ha utilizado para la especiación de organomercuriales en muestras medioambientales, pero actualmente ha sido sustituido por otros detectores más sensibles.

■ **GC-AFS.** La fluorescencia atómica una de las técnicas de determinación de mercurio más sensibles y selectivas que existe en la actualidad. Su acoplamiento a la cromatografía de gases puede llevarse a cabo mediante un método de derivatización on-line de las especies (vapor frío), o mediante un pirolizador, al igual que lo que ocurría con la espectroscopía de absorción atómica. En cuanto a la introducción de muestra en el cromatógrafo, existen tanto métodos donde se emplea la derivatización previa<sup>42,92</sup> (alquilación), como la inyección directa de la fase orgánica resultante de la extracción.

Bloom y col. y Fischer y col.<sup>93</sup> desarrollaron este acoplamiento para la determinación conjunta de mercurio inorgánico y metilmercurio en el campo medioambiental. Utilizando el acoplamiento GC-AFS, Alli y col. desarrollaron un método de extracción para metil- y etilmercurio basado en el protocolo de Westö. Este nuevo método fue aplicado a muestras biológicas por Armstrong y col.<sup>94</sup> proporcionando un límite de detección entre 0.2 y 0.3 pg para metil-, dimetil- y etilmercurio.

■ **GC-AES.** La espectroscopía de emisión atómica acoplada a un cromatógrafo de gases se utiliza ampliamente para la detección de organomercuriales. Grossman y col.<sup>95</sup> efectuaron el acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un detector de plasma de microondas obteniendo un límite de detección para mercurio como dimetilmercurio de 0.26 ng. Más tarde Quimbyet y col.<sup>96</sup> describieron el acoplamiento de un plasma de microondas mantenido a presión atmosférica con un cromatógrafo de gases obteniendo un límite de detección como difenilmercurio de 1 pg.

Actualmente el plasma inducido por microondas (MIP-AES) se ha convertido en uno de los detectores específicos más populares para mercurio. La detección mediante medida de emisión atómica es ventajosa en el caso de los compuestos metilados, debido a su intensa emisión y baja señal de fondo, lo que proporciona una excelente sensibilidad y un alto grado de selectividad. En la mayoría de los casos en los que se usa el sistema GC-MIP-AES, la muestra se introduce previa derivatización de los analitos (alquilación)<sup>25,57,97,98</sup>, por lo que es posible eliminar los problemas ocasionados en la separación de los haluros de mercurio. El sistema GC-MIP-AES se ha empleado también con el sistema de espacio de cabeza para la introducción de muestra<sup>99</sup> (Head

Space, HS). Con este fin se adiciona ácido yodoacético y ácido sulfúrico para facilitar la volatilización de los analitos.

■ **GC-ICP-MS.** La introducción del plasma ICP como fuente de iones para la espectrometría de masas durante los años 80, ha popularizado su uso como detector de metales traza debido a su especificidad, alta sensibilidad y carácter multielemental. Además acoplado a una técnica de separación se ha convertido en una técnica muy extendida en estudios de especiación. A diferencia del acoplamiento HPLC-ICP-MS, la unión de este detector a la cromatografía de gases es más compleja y requiere del empleo de una interfase adecuada. Además de sus buenas prestaciones, esta técnica permite, mediante la medida de relaciones isotópicas, obtener información sobre las posibles transformaciones de las especies durante los procesos de extracción. Hintelmann y col. utilizaron esta técnica junto con trazadores isotópicos para la determinación del grado de metilación y demetilación de las especies de mercurio presentes en sedimentos. También estableció el porcentaje de formación de metilmercurio durante los procesos de extracción basados en destilación mediante la adición de  $^{199}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  a las muestras. Por otro lado, Tu y col. evaluaron la posible formación de metilmercurio durante el pretratamiento de muestra mediante la adición de  $^{201}\text{Hg}^{2+}$  a muestras biológicas (pescado y marisco). García Alonso y col.<sup>100</sup> emplearon estudios de relaciones isotópicas para evaluar la efectividad de la extracción del material de referencia DOLT-2 con HCl concentrado, NaCl y agitación mecánica. Para confirmar la ausencia de transformaciones durante esta etapa se añadió mercurio enriquecido en el isótopo  $^{202}\text{Hg}$ .

En la bibliografía se pueden encontrar otras combinaciones, como cromatografía de gases-absorción atómica con cámara de grafito<sup>66,101</sup> (GC-ETAAS) o cromatografía de gases-espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (GC-FTIR).

En la Tabla 9 se recogen las principales aplicaciones de la cromatografía de gases a la especiación de mercurio en muestras biológicas y medioambientales, incluyendo los límites de detección en cada caso.

**Tabla 9.** Principales aplicaciones de la cromatografía de gases para la especiación de mercurio

COLUMNA	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
CAPILAR	GC-AFS	Sedimentos	MeHg <sub>2</sub> , MeHg, EtHg	Columna: DB-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1 µm )	MeHg, EtHg: 0.2 pg	70
CAPILAR	GC-MS	Pescados y agua de río	MeHg, Hg(II)	Columna: DB-624 (30 m x 0.32 mm d.i., recubrimiento 1.8 µm )	MeHg:6.7 ng l <sup>-1</sup> Hg(II):8.7 ng l <sup>-1</sup>	59
CAPILAR	GC-AFS	Agua de mar	MeHg, EtHg	Columna: DB-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1 µm )	MeHg, EtHg:0.01 ng l <sup>-1</sup>	83
CAPILAR	GC-AFS	Agua de lago	MeHg, Hg(II)	Columna: DB-624 (30 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 3 µm )	MeHg, Hg(II): 0.5 pg	91
EMPAQUETADA	CT-GC-QFAAS	Sedimentos, tejidos biológicos y agua	MeHg, Hg(II)	Columna: Chromosorb W-HP recubierto con 10% SP-2100	0.1 ng g <sup>-1</sup> - 3 ng g <sup>-1</sup>	36
CAPILAR	GC-AFS	Suelos y sedimentos	MeHg, EtHg	Columna: DB-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1µm ) y DB-17 (30 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1.5 µm )	0.01 ng g <sup>-1</sup>	84
CAPILAR	GC-AFS GC-ICP-MS	Muestras marinas	MeHg, EtHg	Columna: DB-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1.5 µm )	AFS: 0.25 pg ICP-MS: 0.9 pg	94

COLUMNA	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
CAPILAR	GC-AAS GC-MIP-AES	Standards	MeHg, Hg(II)	Columna: DB-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1.5 $\mu\text{m}$ ) y DB-624 (30 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 3 $\mu\text{m}$ )	--	74
CAPILAR	GC-MIP-AES GC- ICP-MS	Pescados	MeHg	Columna: DB-624 (30 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 3 $\mu\text{m}$ ) y BP-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1.5 $\mu\text{m}$ )	MIP-AES: 4.4 ng g <sup>-1</sup> ICP-MS: 2.6 ng g <sup>-1</sup>	50
CAPILAR	GC-CV-AFS	Pelo humano	MeHg, Hg(II)	Columna: DB-5 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1.5 $\mu\text{m}$ )	MeHg: 50 ng g <sup>-1</sup> Hg(II): 80 ng g <sup>-1</sup>	63
CAPILAR	GC-MIP-AES	Gas	MeHg, Hg(II)	Columna: HP-5 (15 m x 0.32 mm d.i., recubrimiento 0.25 $\mu\text{m}$ )	0.08 pg	77
CAPILAR	GC-FAPEs	Pescados	MeHg, Hg(II)	Columna: DB-5MS (30 m x 0.25 mm d.i., recubrimiento 0.25 $\mu\text{m}$ )	MeHg: 1.5 ng g <sup>-1</sup> Hg(II): 0.7 ng g <sup>-1</sup>	43
MULTICAPILAR	MCGC-ICP- TOFMS	Pescados	MeHg, Hg(II)	Columna: MC-1 HT: 900 capilares x 1m x 40 $\mu\text{m}$ d.i., recubrimiento 0.2 $\mu\text{m}$	MeHg: 16 fg g <sup>-1</sup> Hg(II): 257 fg g <sup>-1</sup>	52
MULTICAPILAR	MCGC-ICP- TOFMS	Hielo (Antártida)	MeHg, Hg(II)	Columna: MC-1 HT: 900 capilares x 1m x 40 $\mu\text{m}$ d.i., recubrimiento 0.2 $\mu\text{m}$	MeHg: 0.027 pg g <sup>-1</sup> Hg(II): 0.27 pg g <sup>-1</sup>	47



COLUMNA	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
CAPILAR	GC-ICP-MS	Agua de mar	MeHg, Hg(II)	Columna: HP-5 (15 m x 0.32 mm d.i., recubrimiento 0.25 $\mu\text{m}$ )	MeHg: 0.11 $\text{pg g}^{-1}$ Hg(II): 0.35 $\text{pg g}^{-1}$	64
CAPILAR	GC-MS	Aguas naturales	MeHg, Hg(II)	Columna: HP-5MS (30 m x 0.25 mm d.i., recubrimiento 0.25 $\mu\text{m}$ )	$\approx \text{ng l}^{-1}$	62
CAPILAR	GC-AFS	Marisco	MeHg, Hg(II)	Columna: SPB-1 (15 m x 0.53 mm d.i., recubrimiento 1.5 $\mu\text{m}$ )	MeHg: 1.7-220 $\text{ng g}^{-1}$	75
CAPILAR	GC-MS	Aguas superficiales	EtHg, MeHg, Hg(II)	Columna: HP-5MS (30 m x 0.25 mm d.i., recubrimiento 0.25 $\mu\text{m}$ )	EtHg: 1.5 $\text{ng l}^{-1}$ MeHg: 1.5 $\text{ng l}^{-1}$ Hg(II): 1.0 $\text{ng l}^{-1}$	76

## Cromatografía líquida

Una alternativa a la cromatografía de gases, es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Aunque esta técnica acoplada a detectores atómicos o de masas es menos sensible, resulta más apropiada para la separación de especies polares, lo que supone una ventaja en la especiación de mercurio inorgánico y orgánico. Además, la versatilidad de la cromatografía de líquidos, con más mecanismos de separación disponibles, es mayor que la de la cromatografía de gases, lo cual permite conseguir una mejor separación de las especies de mercurio en muestras medioambientales complejas con un tratamiento de la muestra más sencillo que no requiere etapas previas de derivatización.

Prácticamente la totalidad de los métodos encontrados en la bibliografía que emplean la técnica de HPLC, se basan en la utilización de separaciones en fase reversa donde la fase estacionaria se encuentra fijada a una base de sílice<sup>102</sup>.

Con el fin de mejorar la separación cromatográfica y/o evitar la adsorción de las especies de mercurio en la fase estacionaria generalmente se emplean agentes complejantes como la cisteína o  $\beta$ -mercaptoetanol o agentes formadores de pares iónicos<sup>69,102</sup>.

## Detección

En cuanto a los sistemas de detección, el espectrómetro ultravioleta-visible sigue siendo utilizado aprovechando la absorción que en este intervalo del espectro presentan los complejos de mercurio-tioderivados<sup>24,103,104</sup>. Sin embargo, debido a los elevados límites de detección, el acoplamiento HPLC-UVvis siempre va precedido de una etapa de preconcentración donde se utiliza de nuevo el material cromatográfico para fase reversa, aunque esta vez modificado con algún compuesto afín al mercurio, normalmente tioderivados como dietilditiocarbamato (DDTC) o ditizona.

La detección más efectiva en HPLC implica el uso de un detector atómico específico para mercurio. En este caso la columna se acopla al detector mediante un método de derivatización *on-line* de las especies separadas. Así, mediante la generación de vapor frío tanto CV-AAS<sup>105,106</sup>, CV-AFS<sup>51,107,108,109,110,111</sup> como CV-ICP-MS<sup>112,113</sup> se han acoplado a la cromatografía líquida, disminuyendo los límites de detección, y facilitando así la detección de especies de mercurio en muestras de interés medioambiental, clínico y nutricional. A estos acoplamientos, se les puede incorporar lámparas de UV<sup>51,114,115,116</sup> entre el cromatógrafo y el detector, u oxidar en línea con KBr/KBrO<sub>3</sub><sup>117,118</sup>, dicromato potásico con<sup>119,120</sup> o sin<sup>121</sup> cadmio o persulfato potásico acidificado en presencia de sulfato

de cobre<sup>122,123,124</sup> con la finalidad de convertir las especies organomercúricas a mercurio inorgánico.

Quizás el sistema de detección más utilizado en la actualidad, aplicado a las separaciones con HPLC de compuestos de mercurio es el espectrómetro de masas acoplado a una fuente de plasma inducido por radiofrecuencia (ICP-MS)<sup>108,112,125,126,127</sup>. Este sistema de detección permite en la mayoría de los casos la detección directa sin necesidad de una etapa de preconcentración. El punto crítico del acoplamiento es probablemente la interfase entre el cromatógrafo y el plasma, inconveniente que se ha logrado superar con sistemas como el nebulizador por inyección directa (DIN) o el nebulizador hidráulico de alta presión<sup>108</sup> (HPF/HHPN).

### 3.2. TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS

Aunque las separaciones cromatográficas son las más habituales en la especiación de mercurio, las no cromatográficas pueden ser utilizadas con éxito para la separación de varias especies de mercurio en una determinada muestra.

Dentro de las separaciones no cromatográficas destaca la electroforesis capilar (CE). Esta técnica no se encuentra en el mismo grado de desarrollo que las descritas con anterioridad en lo que a especiación de mercurio se refiere. La técnica CE se caracteriza por el empleo de capilares de diámetros internos muy pequeños, lo que le confiere una elevada eficiencia de separación debido a la elevada movilidad electroforética de las especies cargadas, pero a su vez limita su sensibilidad incluso cuando se acopla a detectores altamente sensibles<sup>128</sup>. El empleo de la electroforesis capilar como técnica de separación suele ir asociada a procesos de preconcentración previos<sup>129</sup> o al uso de los detectores más sensibles como es el ICP-MS<sup>130,131</sup>.

La incorporación de una interfase (generación de especies volátiles) entre la electroforesis capilar y el ICP-MS puede conducir a la mejora de los límites de detección de la CE-ICP-MS convencional<sup>132</sup>.

Por otra parte, la determinación de las especies de mercurio puede llevarse a cabo basándose en el empleo de métodos de análisis selectivos para una de las formas químicas del analito (generalmente el mercurio inorgánico). En estos casos el análisis se realiza por etapas debido al distinto comportamiento de Hg(II) y MeHg<sup>+</sup> frente a los agentes reductores. El mercurio inorgánico puede reducirse a Hg(0) empleando SnCl<sub>2</sub>, mientras que el MeHg<sup>+</sup> no se reduce. De esta forma, la determinación directa de mercurio en la muestra informa sólo del contenido en mercurio inorgánico. Una segunda determinación tras un tratamiento previo de la muestra en el que se oxida el metilmercurio

(foto-oxidación<sup>133</sup>, oxidación con KBr/KBrO<sub>3</sub> o dicromato potásico) proporciona el contenido en mercurio inorgánico total. Por diferencia se puede conocer el contenido del mercurio orgánico presente en la muestra. Este hecho permite llevar a cabo una especiación sencilla usando absorción atómica como detector<sup>134,135,136</sup>.

Además, el metilmercurio y el mercurio inorgánico pueden ser separados mediante métodos de extracción líquido-líquido utilizando ácidos halogenados y disolventes orgánicos<sup>137</sup> y cuantificándolos de forma análoga a lo comentado anteriormente.

#### 4. EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE SELENIO

Las técnicas de extracción más empleadas en la especiación de selenio presente en muestras de interés nutricional, clínico y medioambiental se pueden dividir en dos grandes grupos: con disolventes y por hidrólisis.

##### 4.1. Extracción con disolventes

La determinación de especies de selenio en muestras biológicas y medioambientales requiere la extracción previa de las mismas mediante el empleo de métodos que aseguren la conservación de la forma química y la distribución del elemento original. En los últimos años, se ha producido un considerable aumento en el número de trabajos publicados que presentan diferentes métodos para la extracción de especies de selenio, basados en el empleo de disolventes. En estos procesos, el parámetro más crítico es la elección del extractante más adecuado, por lo que es necesario considerar factores tales como la forma química a extraer, la naturaleza de la muestra y la técnica de detección seleccionada para la determinación<sup>138</sup>.

Algunos autores realizan la extracción de especies de selenio orgánicas e inorgánicas en muestras biológicas y medioambientales empleando distintos disolventes o mezclas de los mismos. El proceso tiene por finalidad tanto el desarrollo de métodos no destructivos para el análisis de especies de selenio en muestras sólidas, como la determinación de la fracción de compuestos solubles. El porcentaje de extracción (calculado con relación al contenido total del analito en la muestra) varía en función de la naturaleza de la misma, aunque no suele ser superior al 50%.

La extracción con agua se ha aplicado a la extracción de especies solubles en levaduras<sup>2,3,139,140,141</sup> suplementos nutricionales<sup>142</sup>, plantas (champiñón<sup>143,144</sup>, coco de mono<sup>145</sup>), pescados<sup>140,141</sup>, etc. Los protocolos utilizados son muy variados, pudiendo oscilar el tiempo de tratamiento entre 1 hora y 24 horas. Además, para evitar la actividad proteolítica de ciertas enzimas presentes en la propia muestra que podrían provocar la destrucción de las proteínas dando lugar a un error por exceso al cuantificar los selenoaminoácidos libres, varios autores añaden al agua fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para extraer selenocompuestos solubles de levaduras<sup>146,147</sup>.

Algunos autores han estudiado la extracción de especies de selenio utilizando medios regulados a pH neutro. De esta forma Slejkovec y col.<sup>148</sup> utilizaron una mezcla Tris-HCl (0.05 M)-KCl (0.1 M) a pH 7.5, para extraer los compuestos de selenio presentes en muestras de champiñón, obteniendo recuperaciones del 70%. Sin embargo, en estudios realizados por Stefánka y colaboradores sobre este tipo de muestra, los porcentajes de extracción obtenidos fueron del 40%, tanto en agua, como en Tris-HCl 0.05 M (pH=2.1) o

en fosfato 0.05 M (pH=7.6). Önnig y Bergdahl<sup>149</sup> también llevaron a cabo la extracción de los compuestos de selenio en un medio regulado a pH 7.5 (Tris-acético 20 mM:NH<sub>4</sub>Ac 0.14 M, 1:1). Este proceso fue aplicado a muestras de pescado, obteniéndose recuperaciones del 47% para la platija y del 23% para el bacalao. Recientemente Roberge y col.<sup>150</sup> llevaron a cabo estudios de especiación de selenio en muestras de brócoli bajo 27 condiciones distintas, empleando 9 sistemas regulados diferentes (pH entre 1 y 9). Los mejores resultados fueron obtenidos para el medio fosfato a pH 7.0.

Las extracciones con mezclas acuo-orgánicas también son frecuentes. Así, Lindemann y col. utilizaron la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O en proporción 1:1 para extraer selenocompuestos en pescado en un baño de ultrasonidos. De forma similar se ha empleado la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) y la adición de 0.28M HCl o 4% NH<sub>3</sub><sup>151</sup>. De esta forma, Jakubowski y col.<sup>152</sup> consiguieron un 30% de eficiencia en la extracción de especies de selenio en huevos de gaviota, empleando la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1).

Las mezclas EtOH:CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O aplicadas a muestras de trébol blanco han permitido obtener eficiencias del 15 y 20%, respectivamente<sup>153</sup>. Los resultados obtenidos mejoran cuando el proceso se lleva a cabo con MeOH:H<sub>2</sub>O adicionando un 4% de NH<sub>4</sub>OH, consiguiéndose extraer el 45% del selenio presente en este material.

La extracción con la mezcla MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (5:3:2) también se ha propuesto<sup>154</sup>. Este método fue posteriormente modificado por Potin-Gautlier y col.<sup>155</sup> y Emteborg y col. y se aplicó a diferentes matrices. Se obtuvieron recuperaciones del 19, 28, 37 y 47% cuando la extracción se realizaba en MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O: (5:3:2), MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) en HCl 0.28M, y MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) en NH<sub>4</sub>OH al 4%, respectivamente. Igualmente la mezcla MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (12:5:3) se ha aplicado a muestras de cebolla enriquecida con selenio para la extracción de compuestos de bajo peso molecular<sup>156</sup>.

Recientemente se ha empleado la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) junto con la técnica de extracción con disolventes acelerada (ASE) y se comparó con procedimientos de extracción tradicionales como la agitación mecánica, sonicación y Soxhlet. Los mejores resultados se obtuvieron con la técnica ASE, aunque no superaron el 10% de extracción<sup>157</sup>.

Otros métodos se basan en el empleo de disoluciones ácidas. Larsen y col.<sup>158</sup> han utilizado ácido tricloroacético al 10% para extraer los selenocompuestos solubles en agua de muestras de algas. También es bastante habitual el uso de HCl para extraer los selenocompuestos de muestras biológicas. Así, se han tratado suplementos nutricionales con HCl 0.1N y CHCl<sub>3</sub> (1:1) en un baño de ultrasonidos (10 min)<sup>159</sup>, y también con HCl 2 M en un horno de microondas a 95°C durante 2h. Otros autores han utilizado HCl 0.1M y agitación durante toda la noche (a 37°C) o incluso 24 horas para tratar diferentes muestras biológicas<sup>160,161</sup>.

En otros trabajos se utilizan mezclas de metanol (10%) en HCl 0.2M y agitación en ultrasonidos durante 1h, para la extracción de las especies de selenio en ajo, cebolla y brócoli enriquecidos, obteniéndose recuperaciones del 10%, para los dos primeros, y del 100 %, para el último<sup>162</sup>.

Una forma de extracción de compuestos de selenio de bajo peso molecular consiste en la adición de HClO<sub>4</sub> 0.4M seguido de un tratamiento en baño de ultrasonidos durante dos horas, o la mezcla HClO<sub>4</sub>:EtOH (8:2). Esta metodología se ha empleado en la extracción de selenio en frutos secos<sup>163</sup> y cebolla.

Los tensoactivos se han utilizado para la evaluación de la fracción de selenio enlazada a proteínas en distintas muestras biológicas (levadura, tejidos animales y vegetales) debido a la formación de pares iónicos con las proteínas solubles en agua, lo que supone una mejora de la eficiencia de extracción. El dodecil sulfato sódico (SDS) es un tensoactivo ampliamente utilizado para desnaturalizar proteínas por formación de micelas y ha sido muy empleado en la extracción de selenoproteínas de tejidos de mamíferos<sup>164,165</sup>. La extracción suele llevarse a cabo a 4°C en presencia de inhibidores de proteólisis, con el fin de retardar la actividad enzimática de las enzimas liberadas durante el tratamiento. Casiot y col.<sup>2</sup> aplicaron este proceso para la extracción de compuestos de selenio en muestras de levadura, obteniéndose eficiencias de extracción del 22%.

Recientemente Moreno y col.<sup>166</sup> emplearon SDS (4%) en la extracción de selenio de tejidos animales (ostras, mejillón, gamba, atún, trucha), tejidos vegetales (trébol blanco, harina trigo) y levadura enriquecida. La adición de SDS supuso una mejora de extracción del 50% si se compara con la extracción en medio acuoso, alcanzado recuperaciones entre 20 y 90%.

## **4.2. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS**

El selenio en muestras de origen biológico se encuentra mayoritariamente en forma de selenoaminoácidos. La liberación de los mismos de las proteínas puede realizarse empleando métodos de hidrólisis ácida, básica o enzimática, basados en la ruptura de los enlaces peptídicos. Aunque la eficiencia de extracción de estos procesos suele ser cuantitativa, se pierde la información relacionada con la forma original en que se encontraban las especies de selenio en las proteínas.

### **Hidrólisis ácida**

Estos procesos de hidrólisis se llevan a cabo en medio fuertemente ácido, generalmente HCl y a temperaturas cercanas a 100°C. Se recomienda el empleo de

condiciones anaerobias para prevenir la descomposición por oxidación de las especies, fundamentalmente la selenocistina, por lo que las muestras se suelen tratar con nitrógeno o helio<sup>167</sup>.

El protocolo convencional para el análisis de aminoácidos en proteínas es la hidrólisis con HCl 6M durante 24h a una temperatura próxima a los 110°C<sup>168</sup>. Sin embargo, a pesar de que es un proceso bioquímico rutinario, presenta ciertas inconvenientes, tales como la incompleta hidrólisis de enlaces peptídicos próximos a aminoácidos hidrofóbicos, la pérdida de aminoácidos lábiles (cistina, tirosina, etc)<sup>169</sup> y posible conversión entre la metionina y el sulfóxido de metionina<sup>170</sup>.

Los estudios de estabilidad realizados sobre patrones acuosos sometidos a este tratamiento, muestran resultados algo contradictorios. Broderick y col.<sup>171</sup> afirmaron que SeMet y SeCys<sub>2</sub> eran estables durante 22 horas en medio HCl 6M a 110°C y condiciones anaerobias. Asimismo, Palacios y col.<sup>172</sup> obtuvieron un 94% de recuperación en el caso de la especie SeCys<sub>2</sub>, pero sólo un 20% y un 10% para SeMet y TMS<sup>+</sup>, respectivamente, tras el calentamiento a 110°C durante 24h, en medio HCl 6M exento de oxígeno.

Hammel y colaboradores<sup>173</sup> propusieron en 1997, un método basado en la carboximetilación de los selenoaminoácidos, con el fin de evitar su descomposición durante la hidrólisis ácida. El proceso se aplicó a muestras de tejidos biológicos y a proteínas, identificándose las especies selenocistina y selenometionina.

Algunos trabajos ponen de manifiesto las ventajas del calentamiento por microondas en la hidrólisis ácida de tejidos biológicos. Carvalli y col. llevaron a cabo la hidrólisis en medio HCl 6M, añadiendo fenol hasta una concentración de 0.5% (v/v) para evitar la fácil oxidación de algunos selenoaminoácidos. El calentamiento se realizó a 645W durante 25 min, obteniéndose recuperaciones de selenocistina superiores al 90%. Sin embargo, un estudio más reciente revela que el triptófano, la metionina y la cisteína/cistina son parcialmente destruidos durante un proceso de hidrólisis con microondas<sup>174</sup>.

El empleo del ácido metanosulfónico, de naturaleza no volátil, constituye una alternativa a los procesos de hidrólisis ácida con HCl. Simpson y col.<sup>175</sup> introdujeron esta técnica, que posteriormente fue simplificada por Chiou y col.<sup>176</sup>. Recientemente, se ha publicado el empleo de ácido metanosulfónico 4M y β-mercaptoetanol (calentando a reflujo durante 8h) para el estudio de las especies de este analito presentes en muestras de levadura y nueces del Brasil<sup>177</sup>.

### Hidrólisis básica

Los procesos de hidrólisis básica se llevan a cabo en medios fuertemente alcalinos, empleando, por lo general, hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), reactivo que favorece la solubilización de muestras de origen biológico.



Se ha aplicado, entre otros, a la extracción de selenio en muestras de trigo<sup>178</sup> y en muestras de levadura enriquecida industrialmente en selenio<sup>2,157,179</sup>. En estos casos se obtuvo una buena recuperación del elemento (>70%), si bien acompañada de una notable degradación de las especies ya que el TMAH oxida los selenoaminoácidos y las selenoproteínas a selenio inorgánico.

### **Hidrólisis enzimática**

En la actualidad los tratamientos que han proporcionado los resultados más prometedores para la extracción cuantitativa de las especies de selenio en muestras sólidas son los procesos de hidrólisis enzimática.

Las ventajas que ofrecen estos métodos están relacionadas con el alto grado de selectividad de las enzimas ya que se trabaja en condiciones controladas y moderadas de temperatura y pH. Como consecuencia, se previenen posibles pérdidas por volatilización y se evita la alteración de las distintas formas químicas en que se encuentra el selenio, al no aplicar tratamientos agresivos<sup>180</sup>.

Los procesos de hidrólisis enzimática implican la adición de una enzima sobre la muestra e incubación en un medio regulado a una determinada temperatura. Para alcanzar la máxima actividad enzimática se deben optimizar diversas variables entre las que se incluye la cantidad de enzima respecto a la masa de sustrato, el tiempo de incubación, la naturaleza del medio de extracción, el pH y la temperatura (siendo estos dos últimos factores críticos sobre la actividad enzimática).

Generalmente se utilizan proteasas que rompen los enlaces peptídicos de forma inespecífica para liberar los selenoaminoácidos, siendo la Pronasa E (proteasa XIV aislada de *Streptomyces griseus*)<sup>147,181,182,183,184</sup> la más empleada, aunque también hay ejemplos del uso de proteinasa K<sup>163,185</sup>, pepsina<sup>143,144</sup>, subtilisina<sup>166,184,186</sup>, tripsina<sup>143,147</sup> o Flavourzyme<sup>187</sup> (mezcla de peptidasas). En algunos casos, se utilizan distintas proteasas combinadas o bien se emplean mezclas de proteasas y otras enzimas capaces de romper ciertas estructuras presentes en las muestras para facilitar la extracción de los selenocompuestos. Así, se han combinado proteasas con lipasa<sup>188,189,190</sup> (para degradar los lípidos), lisozima (para romper las membranas exteriores de las bacterias), celulasa (para romper las paredes celulares de los vegetales), etc.

Los buenos resultados obtenidos con estos tratamientos han supuesto un gran auge de los mismos, por lo que, en los últimos años, numerosos grupos de investigación han trabajado en el desarrollo y mejora de las condiciones experimentales más idóneas para llevarlos a cabo.

Este tipo de hidrólisis se ha aplicado a una amplia variedad de muestras biológicas para llevar a cabo estudios de especiación de selenio (suplementos nutricionales, plantas acumuladoras de selenio, champiñones<sup>143,144</sup>, frutos secos<sup>185, Error! Marcador no definido.</sup>, pescados<sup>166,188,191</sup>, mejillones<sup>166,184,186</sup>, ostras, gambas, hígado de delfín), pero sin duda las muestras más ampliamente estudiadas son las levaduras<sup>17,147,157,166,181,182,189</sup>, donde se han alcanzado rendimientos de extracción para el selenio próximos al 90%.

La hidrólisis enzimática suele llevarse a cabo en agua o en disoluciones reguladas de pH próximo al fisiológico, y durante largos tiempos de incubación (típicamente entre 16 y 24 horas). Esto supone un elevado riesgo desde el punto de vista de la transformación de especies ya que la estabilidad de los compuestos puede ser muy crítica. Algunos autores llevan a cabo la hidrólisis en la oscuridad. También existen ejemplos de hidrólisis en dos etapas, de manera que tras una primera hidrólisis se adiciona más enzima y se vuelve a incubar la muestra. Esta última modalidad ha demostrado elevar la eficiencia de la extracción de forma significativa en tejidos de pescado, mejillones y ostras. Recientemente Capello y col. emplearon la sonda de ultrasonidos en el proceso de hidrólisis, lo que permite llevar a cabo la hidrólisis de una manera eficaz con proteasa en sólo 30s en muestras de levadura, evitando así, los riesgos de pérdidas e interconversiones de especies que suponen los largos protocolos tradicionales.

Un caso especial de hidrólisis enzimática es el proceso de hidrólisis gástrica. En este tratamiento, las condiciones de trabajo y las enzimas utilizadas simulan la digestión que ocurre en el estómago, siendo habitual el empleo de pepsina, HCl y NaCl. Este procedimiento es más agresivo, aunque proporciona información que permite predecir la cantidad de selenio que puede ser absorbida durante la digestión, y subsecuentemente transformada a especies metabólicamente activas. Las especies de selenio presentes en los alimentos se caracterizan por una absorción, distribución y toxicidad diferente, por ello para poder evaluar la biodisponibilidad del selenio presente en la dieta, se requiere conocer la concentración del selenio en la fracción bioaccesible, al igual que las especies presentes. Este proceso ha sido aplicado por varios grupos de investigación a distintas muestras. Sutton y col.<sup>192,193</sup> lo aplicaron a diez complejos nutritivos comerciales y Ponce de León y col.<sup>194</sup> a cebolla, ajo y levadura e identificaron diferentes aminoácidos, como selenocistina, selenometionina, formas derivadas de ambas y selenoetionina en el primer caso,  $\gamma$ -glutamil-Se-metilSeCys<sub>2</sub>, Se-metil-L-SeCys<sub>2</sub> y selenio inorgánico, en ajo y cebolla, así como L-SeMet, Se-DL-lantonina y Se-metil-SeCys<sub>2</sub> en la levadura. Crews y col. investigaron los extractos gastrointestinales de bacalao cocinado, identificando la forma inorgánica de Se(IV).

También se han empleado enzimas no proteolíticas con el fin de extraer compuestos de selenio no incorporados a proteínas. De esta forma, se ha utilizado un preparado comercial, Driselasa, consistente en una mezcla de laminarinasa, lixasa y

celulasa, para romper la pared celular de las muestras de levadura enriquecida y liberar las especies de selenio incorporadas en ella<sup>2,147</sup>.

Recientemente, algunos métodos de extracción se han basado en procedimientos de extracción secuencial permitiendo la discriminación de las fracciones solubles y no solubles en agua de selenio. Moreno y col. distinguieron entre la fracción soluble en agua y la no soluble, sometiendo posteriormente ambas fracciones a hidrólisis enzimática. Otros autores distinguen entre la fracción soluble en tampón Tris-HCl, la fracción de proteínas solubles en SDS (Tris-HCl con dodecil sulfato sódico) y el residuo (HNO<sub>3</sub> concentrado), mientras que otros investigadores distinguen entre las especies de selenio solubles en agua (agua caliente), las especies asociadas a la pared celular (Driselasa en tampón Tris-HCl), las selenoproteínas insolubles en agua (Tris-HCl con 179dodecil sulfato sódico) y el residuo (hidróxido de tetrametilamonio). Ruiz-Encinar y col. además de estas fracciones incluyeron la hidrólisis de la fracción de las selenoproteínas residuales con pronasa y lipasa, obteniendo finalmente recuperaciones próximas al 100%.

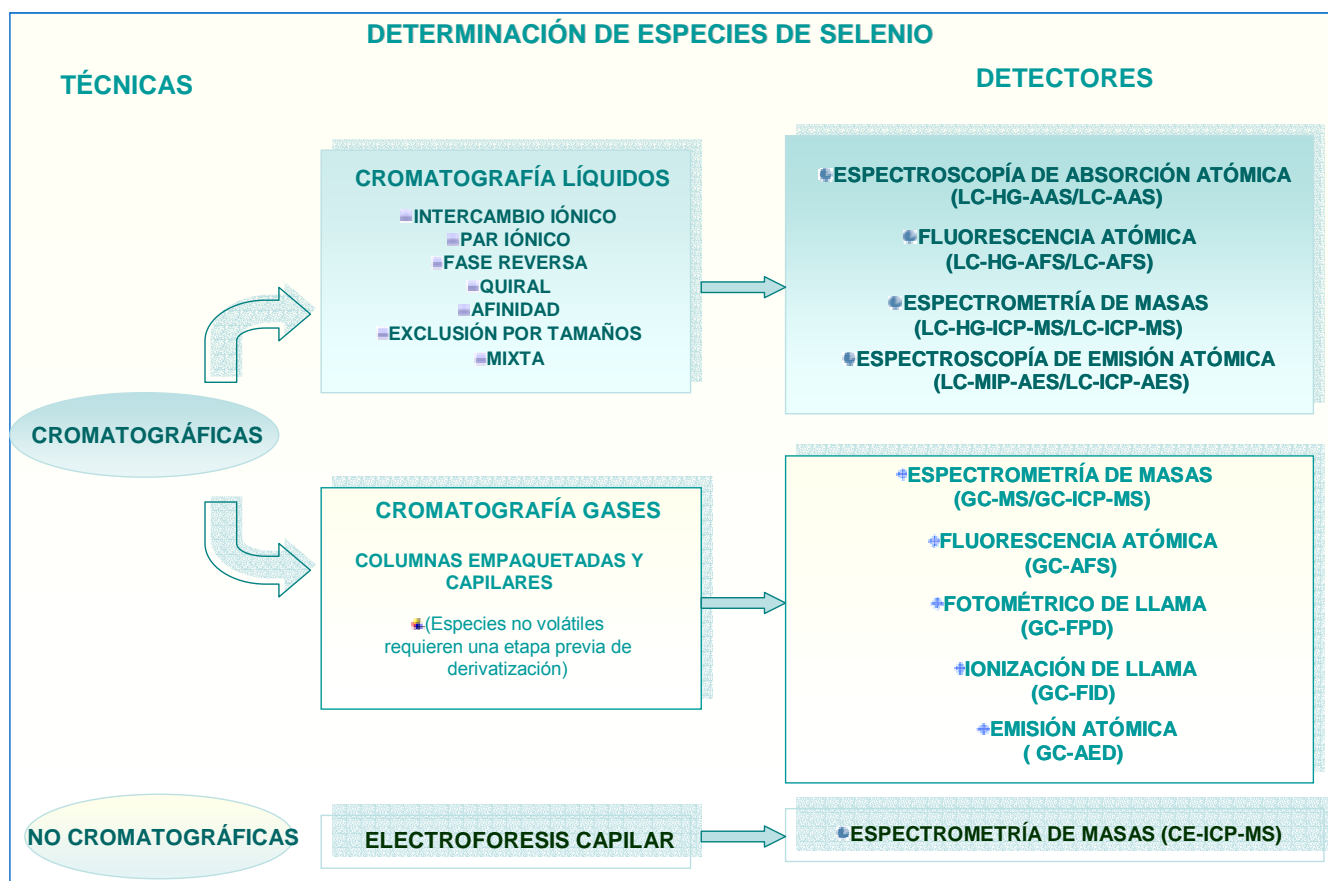
En la Tabla 10 se muestra una recopilación de los métodos de hidrólisis empleados en la determinación de especies de selenio en muestras biológicas en los últimos cinco años, indicando los porcentajes de extracción y las formas químicas identificadas en cada caso.

**Tabla 10.** Métodos de hidrólisis de proteínas empleados en la especiación de selenio en muestras biológicas

MUESTRA	REACTIVO	% EXTRACCIÓN (Se total)	ESPECIES IDENTIFICADAS	PROCESO	REF
Fruto seco	Proteinasa K H <sub>2</sub> O 0.5 M HCl	83 9 37	SeMet	37°C, 20h agitación oscuridad 165°C, 20 min microondas 165°C, 20 min microondas	185
	Proteinasa K	21-25 (en forma SeMet)	SeMet	37°C, 12h	163
	Ácido metanosulfónico 4M	100	SeMet	8h reflujo	187
Levadura enriquecida	Pronasa E Novozym 234 (β-glucosidasa) + Flavourzyme	90 95	SeMet SeMet, formación SeOMet	37°C, 24 h 25°C, 3h baño agua + 50°C, 2h agitación magnética	181
	Pronasa E Subtilisina	101 98	SeMet	30s, sonda de ultrasonidos	17
	Pronasa E	--	SeMet, Se-metilselenocisteína, SeOMet, γ-glutamil-Se-metil- selenocisteína, Se- adenosilselenohomocisteína	Tª ambiente, 24h	182
	H <sub>2</sub> O+ Driselasa + SDS + (pronasa+lipasa)+ TMAH	100	Se(VI), Se(IV), SeMet, SeCys	85-90°C 1h + 37°C, 18h, pH 7.2 + 25°C, 1h, pH 7.2 + 37°C, 16h, pH 7.5 + 60°C, 4h	190
	Pronasa E + Tripsina Driselasa + SDS		SeMet	37°C, 15h	147
	Ácido metanosulfónico 4M	85	SeMet	8h reflujo	187
	Pronasa E + Lipasa	87	SeMet, Se(IV)	37°C, 16h	189
Suplementos nutricionales	0.1M HCl 0.1mM HCl H <sub>2</sub> O	72-103 38-62 63-80	SeMet	vortex 50°C, 2h baño ultrasonido	142
Champiñón	H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O + Pepsina + tripsina Pronasa E	42 83 78	SeMet/Se(IV)	55°C, 1h, pH 5.7 55°C, 1h, pH 5.7 + 37°C, 2h, pH 7.4 37°C, 2h, pH 7.4	143
	H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O +Pepsina+ Tripsina	40 75	SeCys <sub>2</sub> Se(IV)	37°C, 3h, pH 5.7 37°C, 3h, pH 5.7 + 37°C, 20h, pH 2.1+37°C, 20h, pH 7.6	144
Mostaza	HCl (0.5-2M) Pronasa E	37 --	S-(metilseleno)cisteína, SeMet, SeOMet, Se-metilselenocisteína, Se(IV), Se(VI),	Tª ambiente, 24h agitación,	183
Ostra	Subtilisina	74	SeMet/TMSe	37°C, 24h (2 veces)	186
	Pronasa E Subtilisina	94 90	SeMet/TMSe	37°C, 24h (2 veces)	184
Pescados	Subtilisina	30-40 (en forma SeMet)	SeMet/TMSe	37°C, 24h (2 veces)	166
	Pronasa E Pronasa E + Lipasa MeOH/HCl	70 63 5	SeMet	37°C, 16 h 37°C, 16 h 1,5 h ultrasonidos	188
	Digestión gástrica Digestión intestinal	51 61	Se(IV)	37°C, 4h 37°C, 4h	191

## 5. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO

En los últimos años se ha producido un gran auge en el desarrollo de una nueva generación de métodos analíticos suficientemente sensibles y selectivos que permiten la identificación, caracterización y determinación de las distintas especies de selenio a través del acoplamiento de técnicas instrumentales de separación y de detección, de manera que las distintas formas químicas son separadas selectivamente y posteriormente cuantificadas. Entre las técnicas de separación, la más popular para el análisis de especiación en muestras biológicas es la cromatografía líquida, seguida de la cromatografía de gases, y en menor extensión, la electroforesis capilar. Por lo que se refiere a la detección, las técnicas de espectrometría atómica y el ICP-MS son las más empleadas (figura 7).



**Figura 7.** Resumen de las diferentes técnicas analíticas empleadas para la determinación de especies de selenio

## 5.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

### Cromatografía líquida

La cromatografía de líquidos ha sido ampliamente utilizada para especiar selenio en materiales biológicos y medioambientales debido a que ofrece la posibilidad de separar la mayoría de los selenocompuestos de interés (las especies no volátiles) sin necesidad de una etapa previa de derivatización.

Una de las ventajas más importantes de la cromatografía líquida es la alta flexibilidad de los mecanismos de separación mediante el uso de diferentes fases móviles y fases estacionarias, proporcionando prácticamente todo lo necesario para la separación de las diferentes especies de selenio<sup>195</sup>.

La cromatografía de intercambio iónico posee una elevada eficiencia de separación y una amplia versatilidad, proporcionando soluciones a muchos de los problemas planteados en la especiación. La retención relativa de las especies iónicas viene definida por tres variables: pH, fuerza iónica de la fase móvil y la naturaleza del intercambiador iónico. Su empleo para la separación de selenocompuestos cargados como el selenito, el selenato o el trimetilselenonio resulta muy adecuado<sup>196</sup>. El intercambio aniónico y catiónico son mecanismo de separación complementarios que permiten la resolución de un gran número de selenocompuestos presentes en muestras de interés biológico y nutricional.

La mayoría de los selenocompuestos son demasiado hidrofílicos para ser retenidos y separados por fase reversa (Reversed-phase, RP) (típica fase estacionaria C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>)<sup>197</sup>. Sin embargo, la RP ha sido empleada para la separación de selenocompuestos en matrices salinas como la orina<sup>198</sup>. Además, la formación de pares iónicos (empleando fundamentalmente ácidos carboxílicos fluorados como el ácido trifluoracético<sup>2,199</sup>, el ácido heptafluorobutanoico<sup>200</sup> o el ácido octanosulfónico<sup>201</sup>) permite extender la aplicación de RP a compuestos polares de selenio. En este sentido, la cromatografía de pares iónicos es, en la actualidad, una de las más populares para la especiación de selenio y ha permitido separar hasta 20 compuestos de este elemento. Se caracteriza por proporcionar una elevada resolución, y la posibilidad de empleo de múltiples fases móviles.

Otra posibilidad es utilizar cromatografías mixtas, de manera que el analito y la fase estacionaria interactúan por varios mecanismos, p.e. simultáneamente como de fase reversa y de intercambio iónico. Para ello puede modificarse una fase estacionaria C<sub>18</sub> con monómeros de bromuro de dodecilamonio (BDDA) dando lugar a lo que se ha denominado cromatografía vesicular<sup>202</sup>, o bien utilizar columnas comerciales con grupos C<sub>18</sub> y cambiadores iónicos.

Recientemente, se ha empleado la cromatografía de exclusión por tamaños (Size Exclusion Chromatography, SEC) caracterizada por su alta tolerancia a la matriz de las

muestras. Sin embargo, su poder de resolución, relativamente bajo, hace que su principal aplicación sea a escala preparativa o en estudios preliminares (p.e. conocer el tamaño molecular de las especies de interés o aislar dichas especies de la matriz para luego separarlas por otra modalidad cromatográfica). Algunos trabajos han empleado esta técnica con fines analíticos, por ejemplo la separación de selenoproteínas en tejidos animales<sup>149,203</sup>, vegetales<sup>204,205,206</sup> y leche materna<sup>207</sup>.

Para casos muy concretos se puede recurrir a la cromatografía de afinidad, donde la fase estacionaria interacciona específicamente con un determinado analito. En especiación de selenio se ha utilizado para analizar las proteínas que contienen este elemento en plasma y suero empleando dos columnas de afinidad en serie<sup>208</sup> o combinando esta cromatografía en línea con SEC<sup>209</sup>.

La presencia de carbonos asimétricos en los  $\alpha$ -selenoamionácidos produce enantiómeros quirales con diferentes actividades fisiológicas. Por ejemplo, la selenometionina es un aminoácido ópticamente activo, y la bioquímica de los organismos vivos exhibe una fuerte enantioselectividad. Se sabe que la forma L-de los aminoácidos es la única que puede ser utilizada por el hombre, y de ahí el interés en determinar en qué forma se encuentra la selenometionina en las muestras de interés nutricional. La separación enantiomérica mediante HPLC es posible mediante el empleo de fases estacionarias quirales ( $\beta$ -ciclodextrinas, éteres corona o antibióticos como la teicoplanina) que interaccionan de forma diferente con los dos enantiómeros y permite así su separación<sup>210,211</sup>.

En la Tabla 11 se recogen las principales aplicaciones de HPLC a la especiación de selenio en muestras biológicas, llevadas a cabo en los últimos cinco años, clasificadas en función del mecanismo de interacción de la fase estacionaria con el analito.

## **Detección**

En lo que se refiere a los sistemas de detección utilizados a la salida de la columna, los acoplamientos en línea de la cromatografía líquida con un detector atómico como la AAS, la AFS, el ICP-AES, el MIP-MS y el ICP-MS resultan ser muy adecuados por su sensibilidad y selectividad, para llevar a cabo la especiación de selenio a nivel de trazas. De todos ellos el que mejores límites de detección presenta es el ICP-MS, sin embargo, dicha sensibilidad puede resultar todavía insuficiente a la hora de realizar los estudios de especiación a los niveles de concentración habituales de las distintas especies de selenio en las muestras reales.

**Tabla 11.** Principales aplicaciones de HPLC para la especiación de selenio en muestras biológicas

MECANISMO SEPARACIÓN	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
FASE REVERSA	ICP-MS	Orina	Se-metilseleno-N-acetil galactosa amina	Columna: Luca C <sub>18</sub> , 250mm x 15mm Fase móvil: 200mM acetato amónico + 5% MeOH	--	212
	ICP-MS	Levadura	SeMet	Columna: C4, 250mm x 4.6mm Fase móvil: 0.1% TFA H <sub>2</sub> O:MeOH	--	147
	ICP-MS	Planta ( <i>Lecythis ollaria</i> )	Se(IV), Se(VI), Secistationina	Columna: C18 Hypersil ODS, 150 mm x 4.6 mm Fase móvil: tampón fosfato 0.025mM, pH 6.8 y CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH 70:30	--	145
PAR IÓNICO-FASE REVERSA	ICP-MS	Levadura y suplemento nutricional	SeMet, Se(IV), $\gamma$ -glutamyl-Se-metil-selenocisteína, Se-adenosilselenohomocisteína	Columna: Symmetry Shield RP8, 150mm x 3.9mm XTerra RP-C <sub>18</sub> , 150mm x 9.6mm Fase móvil: 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) / 0.1% ácido heptafluorobutanoico (HFBA)	--	182
	ICP-MS	Fruto seco	SeMet	Columna: C <sub>8</sub> Altima, 150mm x 4.6mm Fase móvil: (5 mM ácido cítrico, 5 mM ácido hexanosulfónico pH 4.5): metanol 95:5	--	163
	ICP-MS/UV	Fruto seco y levadura	SeMet	Columna: C <sub>8</sub> Altima, 150mm x 4.6mm Fase móvil: (5 mM ácido cítrico, 5 mM ácido hexanosulfónico pH 4.5): metanol 95:5	--	177
	ICP-MS	Cebolla	Se-metilselenocisteína, Secys, Secys <sub>2</sub> , SeMet	Columna: C <sub>8</sub> Altima, 150mm x 4.6mm Fase móvil: (5 mM ácido cítrico, 5 mM ácido hexanosulfónico pH 4.5): metanol 95:5	--	156
	ICP-MS	Fruto seco	SeMet	Columna: C <sub>8</sub> Altima, 150mm x 4.6mm Fase móvil: (5 mM ácido cítrico, 5 mM ácido hexanosulfónico pH 3.5): metanol 90:10	--	185



MECANISMO SEPARACIÓN	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
PAR IÓNICO-FASE REVERSA	HHPN-AFS	Champiñón	SeCys <sub>2</sub> , SeMet, Se(IV)	Columna: LiChroCART 125-4 Fase móvil: 0.01mM tampón acetato amónico pH 4.0, 0.5% v/v, 10 <sup>-5</sup> M DDAB 100 mM tampón acetato amónico pH 6.5, 0.5% v/v, 10 <sup>-5</sup> M DDAB	--	144
	HG-AFS	Champiñón	SeCys <sub>2</sub> , Se(IV)	Columna: LiChroCART 125-4 Fase móvil: 0.01mM tampón acetato amónico pH 4.0, 0.5% v/v	SeCys <sub>2</sub> : 18 µg l <sup>-1</sup> , SeMet: 70 µg l <sup>-1</sup> , Se(IV): 16µg l <sup>-1</sup>	143
	ICP-MS	Brócoli	SeMet, Se(IV), Se(VI), ácido metilselenínico, Se-metilselenocisteína, ácido selenoico de selenometionina y Se-metilselenocisteína	Columna: Symmetry Shield RP8, 150mm x 3.9mm Fase móvil: 0.6% HBA	--	150
	ICP-MS	Planta ( <i>Brassica juncea</i> )	Se(IV), Se(VI), SeOMet, Se-metilselenocisteína, S-(metilseleno)cisteína, SeMet	Columna: XTerra RP-C18, XTerra MS-C18, Shield RP-C18, Shield RP-C8, Fase móvil: 0.1% HBA, 1% MeOH, 99% H <sub>2</sub> O	--	183
	ES-MS-MS	Levadura	SeMet	Columna: XTerra MS-C18 Fase móvil: 0.01% TEACI, 2% MeOH, pH 4.5	14.8 µg l <sup>-1</sup>	213
IONICO	ICP-MS	Ostra, mejillón, gamba, atún, trucha, trébol, levadura, harina trigo	TMSe, SeMet, Se(IV), SeCys <sub>2</sub>	Columna: Hamilton PRP-X100, 250mm x 4.1mm Fase móvil: salicilato pH 6.0, citrato pH 4.8, tartárico pH 2.9 Columna: Hamilton PRP-X200 Fase móvil: 4mM formiato de piridina pH 2.8, MeOH: H <sub>2</sub> O 97:3	TMSe: 0.2ng, SeCys <sub>2</sub> : 0.1-0.15ng, SeMet: 0.7-0.55ng, Se(IV): 0.2-0.3ng	166, 184
	ICP-MS	Levadura	SeMet	Columna: Hamilton PRP-X200 Fase móvil: 4mM formiato de piridina pH 2.8, MeOH: H <sub>2</sub> O 97:3	--	17

MECANISMO SEPARACIÓN	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
IONICO	HG-AAS	Orina, agua grifo	SeMet	Columna: Hamilton PRP-X100, 250mm x 4.1mm Fase móvil: tampón fosfato pH 7	1.08 ng ml <sup>-1</sup>	214
	ICP-DRC-MS	Levadura	SeMet, SeOMet	Columna: Ionosphere-5C, 100mm x 3mm Fase móvil: 0.75-8.0mM formiato de piridina pH 3.0-3.2, MeOH: H <sub>2</sub> O 97:3	--	181
FASE REVERSA + IONICO	HG-AFS	Suplementos dietéticos y fórmulas infantiles	Se(IV), SeCys, SeMet	Columnas: Tracer Excel 120 ODSB, 150 mm x 4.0 mm y Hamilton PRP-X100, 150 mm x 4.0 mm Fase móvil: gradiente H <sub>2</sub> O- tampón fosfato	SeCys: 0.35 ng ml <sup>-1</sup> , SeMet: 0.54 ng ml <sup>-1</sup> , Se(IV): 0.40 ng ml <sup>-1</sup>	215
	HG-AFS	Levadura	Se(IV), SeCys, SeMet	Columnas: Tracer Excel C18, 100 mm x 4.0 mm y SAX, 20 mm x 4.6 mm Fase móvil: H <sub>2</sub> O- 0.4% acetato sódico	--	157
QUIRAL	ICP-MS	Leche materna y leche (formula)	L-SeMet, D-SeMet	Columna: Chirobiotic T, 250 mm x 4.6mm	L-SeMet- 3.1 ng ml <sup>-1</sup> D-SeMet- 3.5ng ml <sup>-1</sup>	187
SEC	ICP-MS/UV	Músculo pollo, pavo, pato, cordero y cerdo	Compuestos de selenio solubles en tris-acetato	Columna: Superdex 200 10/30 (10-600 kDa) Fase móvil: tampón Tris-acetato, 3% MeOH (v/v)	--	203
	ICP-MS	Leche materna y leche (formula)	Compuestos de selenio solubles	Columna: Superdex 200 10/30 (10-600 kDa) Fase móvil: 0.1M Tris, pH 7.0	--	207
	ICP-MS/UV	Bacalao y platija	Compuestos de selenio solubles en tris-acetato	Columna: Superdex 200 10/30 (10-600 kDa) Fase móvil: tampón Tris-acetato, pH 7.5	0.20µg l <sup>-1</sup>	149

MECANISMO SEPARACIÓN	DETECCIÓN	MUESTRA	ESPECIES	INFORMACIÓN ADICIONAL	LD	REF
SEC	ICP-MS	Planta ( <i>Brassica juncea</i> )	Compuestos de selenio solubles en tris-HCl	Columna: Superdex 75R 10/30 (70-3 kDa) y Mono Q 5/50 GL FPLC Fase móvil: 30 mM Tris-HCl, pH 7.5	--	204
	ICP-MS	Leguminosa	Compuestos de selenio solubles en tris-HCl	Columna: Superdex 75R 10/30 (70-3 kDa) y Superdex Peptide HR 10/30 (7-0.1 kDa) Fase móvil: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5	--	205
	UV-ICP-MS/ CE-ICP-MS	Fruto seco	Compuestos de selenio solubles en tris-HCl, HCl, SDS, NaOH y agua	Columna: Superdex 200 10/30 (10-600 kDa), Superdex 75R 10/30 (10-600 kDa) y Superdex Peptide (14-0.8 kDa) Fase móvil: 150 mM (NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub> , pH 7.8; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0	--	206
	ICP-MS/UV	Ostra, mejillón, gamba, atún, trucha, trébol, levadura, harina trigo	Compuestos de selenio solubles en H <sub>2</sub> O y SDS	Columna: Biosep-SEC-2000 (300-1 kDa) y Superdex Peptide HR 10/30 (7-0.1 kDa) Fase móvil: 5 mM fosfato sódico, pH 7.2; 5 mM fosfato sódico, 60 mM NaCl, pH 7.5	--	166

En el caso del selenio son varias las interferencias poliatómicas que obstaculizan su determinación utilizando un detector de tipo cuadrupolo. Las principales son la formación de dímeros en el gas plasmógeno,  $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$  y  $^{40}\text{Ar}_2$ , los cuales solapan con los dos isótopos más abundantes de selenio,  $^{78}\text{Se}$  (23.8%) y  $^{80}\text{Se}$  (49.6%). La interferencia producida por  $^{38}\text{Ar}_2$  también dificulta la determinación de  $^{76}\text{Se}$  (9.4%) así como la presencia de impurezas en el argón, típicamente kriptón, que presenta interferencia de superposición isobárica con tres isótopos de selenio:  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{80}\text{Se}$  y  $^{82}\text{Se}$ .

Para superar estos inconvenientes es posible utilizar el ICP-MS provisto de celdas de colisión y reacción. Estos dispositivos permiten eliminar las interferencias poliatómicas debidas al  $^{40}\text{Ar}_2$  sin que la sensibilidad se resienta. De este modo, se alcanza una mayor sensibilidad en los análisis de selenio pues es posible detectar su isótopo mayoritario ( $^{80}\text{Se}$ ). En este sentido, en los últimos tiempos han aparecido un número creciente de estudios de especiación de selenio que emplean equipos ICP-MS con celdas de colisión y reacción<sup>188,189,208</sup>.

Por otro lado, para incrementar la sensibilidad se ha acoplado en línea la generación de hidruros a la salida de una columna cromatográfica. El empleo de esta técnica implica la transformación de todas las especies de selenio eluidas en Se(IV), puesto que este es el único selenocompuesto capaz de genera el hidruro correspondiente de forma eficaz. La generación de hidruros se emplea mayoritariamente cuando la detección se lleva a cabo por AAS o AFS, pero en la bibliografía es posible encontrar también ejemplos de utilización de la generación de hidruros combinada con la detección por ICP-MS.

También se han empleado sistemas más eficaces para la introducción de la muestra. Así se ha descrito el empleo de nebulizadores ultrasónicos USN<sup>216</sup>, DIN, microconcéntricos<sup>217</sup>, de capilar oscilante OCN<sup>218</sup> y el hidráulico de alta presión HHPN<sup>219</sup>.

## **Cromatografía de gases**

Es la técnica más utilizada para la separación de especies volátiles como DMSe o DMDS<sub>2</sub>, que pueden ser separadas con columnas tanto empaquetadas como capilares. De esta forma la cromatografía de gases se ha aplicado al análisis de compuestos volátiles de selenio en plantas acumuladoras de selenio (ajo<sup>220,221</sup>, mostaza y altramuz).

La determinación de especies no volátiles requiere una etapa de derivatización previa que puede llevarse a cabo por formación de piazoselenoles volátiles, tras la reacción con diaminas<sup>222</sup>, por formación de derivados fenilo o por complejación con acetona o ditiocarbamato<sup>223</sup>. Por otro lado, el  $\text{TMSe}^+$  se puede determinar por GC, previa transformación a DMSe en medio alcalino<sup>224</sup>.

## **Detección**

Por lo que respecta a los detectores, sin duda los más utilizados son el Espectrómetro de masas (MS)<sup>178,225</sup> y el detector de emisión atómica (AED)<sup>178,182,226</sup>. Otros detectores de GC utilizados en algunos trabajos son el de ionización de llama (FID)<sup>227</sup>, el de fluorescencia atómica (AFS) y el fotométrico de llama (FPD).

Otra posibilidad, la más popular actualmente, es acoplar el cromatógrafo de gases a un ICP-MS<sup>159,226,228,229</sup>. En este sentido, el acoplamiento de la columna con el ICP-MS presenta ciertas ventajas frente a su análogo con HPLC, puesto que al pasar directamente la fase gaseosa del cromatógrafo al plasma la eficiencia del transporte del gas al ICP-MS es del 100%.

## 5.2. TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS

### Electroforesis capilar

Esta técnica, acoplada a un detector UV, se ha empleado en la separación de las formas inorgánicas de selenio de los aminoácidos SeMet y SeCys<sup>230</sup> y de los compuestos dialquilados<sup>231</sup>. El sistema CE-ICP-MS se ha utilizado en la determinación de las especies inorgánicas de selenio alcanzándose límites de detección de 20 y 30 ng ml<sup>-1</sup>, para selenito y seleniato, respectivamente<sup>232</sup>. La sensibilidad puede mejorarse con el acoplamiento CE-HG-ICP-MS, obteniéndose límites de detección de 10 pg para Se(IV) y 24 pg para Se(VI)<sup>233</sup>.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- <sup>1</sup> Cámara C., Pérez-Conde C., *Toma y tratamiento de muestra*, 2002, pp 175-269. Cámara C. (Ed). Síntesis, Madrid.
- <sup>2</sup> Casiot C., Spuznar J., Lobinski R., Potin-Gautier M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 645.
- <sup>3</sup> Casiot C., Vacchina V., Chassaing H., Szpunar J., Potin-Gautier M., Lobinski R., *Anal. Commun.*, 1999, 36, 77.
- <sup>4</sup> Johansson M., Bordin G., Rodríguez A.R., *Analyst*, 2000, 125, 273.
- <sup>5</sup> Quevauviller P., De la Calle-Guntiñas M.B., Maier E.A., Cámara C., *Mikrochim. Acta*, 1995, 118, 131.
- <sup>6</sup> Gómez Ariza J.L., Morales E., Sánchez-Rodas D., Giráldez I., *Trends in Anal. Chem.*, 2000, 19(2+3), 200.
- <sup>7</sup> Lindemann T., Prange A., Dannecker W., Neidhart B., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 368, 214.
- <sup>8</sup> Uteh J.F., Chou C.L., *Sci. Tot. Environ.*, 1988, 71, 67.
- <sup>9</sup> Deaker M., Maher W., *Anal. Chim. Acta*, 1997, 350, 287.
- <sup>10</sup> Alegría A., Barbera R., Farré R., Moreno A., *Die Nahrung*, 1994, 6, 382.
- <sup>11</sup> Bryce W., Izquierdo A., Luque de Castro M.D., *Analyst*, 1995, 120, 2171.
- <sup>12</sup> Wu S., Feng X., Wittmeier A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 797.
- <sup>13</sup> Guang Lan W., Keong Wong M., Min Sin Y., *Talanta*, 1994, 41(2), 195.
- <sup>14</sup> Guang Lan W., Keong Wong M., *Talanta*, 1994, 41(1), 53.
- <sup>15</sup> Yan Zhou C., Keong Wong M., Lin Koh L., Chin Wee Y., *Mikrochim. Acta*, 1997, 127, 77.
- <sup>16</sup> Mason T.J., *Ultrasonics Sonochem.*, 2003, 10, 175.
- <sup>17</sup> Capelo J.L., Ximénez-Embún P., Madrid-Albarrán Y., Cámara C., *Anal. Chem.*, 2004, 76, 233.
- <sup>18</sup> Sanz-Medel A., *Spechtrochim. Acta B*, 1998, 53, 197.
- <sup>19</sup> Sanz-Medel A., *Analyst*, 1995, 120, 799.
- <sup>20</sup> Dot A., Namiensnik J., *Trends Anal. Chem.*, 2000, 19, 69.
- <sup>21</sup> Potin-Gautier M., *Analisis*, 1997, 25, M22.
- <sup>22</sup> Westöö G., *Anal. Scand.*, 1966, 20, 2131.
- <sup>23</sup> Westöö G., *Anal. Scand.*, 1967, 21, 1967.
- <sup>24</sup> Hempel M., Hintelmann H., Wilken R.D., *Analyst*, 1992, 117, 669.
- <sup>25</sup> Tu Q., Qian J., Frech W., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15, 1583.
- <sup>26</sup> Filipeli M., *Anal. Chem.*, 1987, 59, 116.
- <sup>27</sup> Storelli M.M., Storelli A., Giacomini-Stuffler R., Marcotrigiano G.O., *Food Chem.*, 2005, 89, 295.
- <sup>28</sup> Carro A.M., Rubi W., Bollain M.H., Lorenzo R.A., Cela R., *Appl. Organomet.Chem.*, 1994, 8, 665.

- <sup>29</sup> Lorenzo R.A., Vázquez M.J., Carro A.M., Cela R., *Trends in Anal. Chem.*, 1999, 18(6), 410.
- <sup>30</sup> Hempel M., Hintelman H., Wilken R.D., *Analyst*, 1992, 117, 669.
- <sup>31</sup> Abuin M., Carro A.M., Lorenzo R.A., *J. Chromatogr. A*, 2000, 889, 185.
- <sup>32</sup> Thibaud Y., Cossa D., *Appl. Organomet. Chem.*, 1989, 3, 257.
- <sup>33</sup> Carro A.M., Mejuto M.C., *J. Chromatogr. A*, 2000, 882, 283.
- <sup>34</sup> Vázquez M.J., Carro A.M., Lorenzo R.A., Cela R., *Anal. Chem.*, 1997, 69, 221.
- <sup>35</sup> Tseng C.M., De Diego A., Martin F.M., Donard O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 629.
- <sup>36</sup> Tseng C.M., De Diego A., Pinaly H., Amouroux D., Donard O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 755.
- <sup>37</sup> Tseng C.M., De Diego A., Wasserman J.C., Amouroux D., Donard O.F.X., *Chemosphere*, 1999, 39(7), 1119.
- <sup>38</sup> Dietz C., Madrid Y., Cámara C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 1397.
- <sup>39</sup> Falter R., Hintelmann H., Quevauviller P., *Chemosphere*, 1999, 39(7), 1039.
- <sup>40</sup> Boylan H.M., Han Y., Kingston H.M., Link D.D., *WTQA2000 Proceedings of the 16<sup>th</sup> Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium*, 2000.
- <sup>41</sup> Filippelli M., *Chemosphere*, 1999, 39(7), 1199.
- <sup>42</sup> Hammerschmidt C.R., Fitzgerald W.F., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5930.
- <sup>43</sup> Bloom N.S.J., *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 1989, 46, 1131.
- <sup>44</sup> Tseng C.M., De Diego A., Martin F.M., Amuroux D., Donard O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 743.
- <sup>45</sup> Grinberg P., Campos R.C., Mester Z., Sturgeon R.E., *Spectrochimica Acta Part B*, 2003, 58, 427.
- <sup>46</sup> Hintelmann H., Falter R., Ilgen G., Evans R.D., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 58, 363.
- <sup>47</sup> Jitaru P., Adams F.C., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1055, 197.
- <sup>48</sup> Cappon C.J., Smith J.C., *Anal. Chem.*, 1977, 49(3), 365.
- <sup>49</sup> Cappon C.J., Smith J.C., *Bulletin Environ. Contaminat. Toxicol.*, 1978, 19, 600.
- <sup>50</sup> Quiang T., Qian J., Frech W., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15, 1583.
- <sup>51</sup> Ramalhosa E., Río Segade S., Pereira E., Vale C., Duarte A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 643.
- <sup>52</sup> Jitaru P., Goenaga Infante H., Adams F.C., *Anal. Chim. Acta*, 2003, 489, 45.
- <sup>53</sup> Bloom N.S., Colman J.A., Barber L., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 358, 371.
- <sup>54</sup> Larsens P., Meuleman C., Leermakers M., Baeyens W., *Anal. Chim. Acta*, 1990, 234, 417.
- <sup>55</sup> Quevauviller P., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 358, 419.
- <sup>56</sup> Río-Segade S., Bendicho C., *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1999, 14, 163.
- <sup>57</sup> Emteborg H., *Analyst*, 1996, 121, 19.

- <sup>58</sup> Emteborg H., Borklund F., Odman F., Karlsson L., Mthiasson L., Frech W., Baxter D.C., *Analyst*, 1996, 121, 19.
- <sup>59</sup> Cai Y., Bayona M.N., *J. Chromatogr. A*, 1995, 696, 113.
- <sup>60</sup> Montuori P., Jover E., Alzaga R., Diez S., Bayona J.M., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1025, 71.
- <sup>61</sup> Yang L., Colombini V., Maxwell P., Mester Z., Sturgeon R.E., *J. Chromatogr. A*, 2003, 1011, 135.
- <sup>62</sup> Centineo G., Blanco González E., Sanz-Medel A., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1034, 191.
- <sup>63</sup> Diez S., Bayona J.M., *J. Chromatogr. A*, 2002, 963, 345.
- <sup>64</sup> Bravo-Sánchez L.R., Ruiz Encinar J., Hidalgo Martínez J.I., Sanz-Medel A., *Spectrochim. Acta Part B*, 2004, 59, 59.
- <sup>65</sup> Bin H., Gui-bin J., Zhe-Ming N., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 1141.
- <sup>66</sup> De Diego A., Tseng C.M., Stoichev T., Amouroux D., Donard O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 623.
- <sup>67</sup> Stoichev T., Rodríguez Martín-Doimeadios R.C., Tessier E., Amouroux D., Donard O.F.X., *Talanta*, 2004, 62, 433.
- <sup>68</sup> Rapsomanikis S., Craig P.J., *Anal. Chim. Acta*, 1991, 248(2), 563.
- <sup>69</sup> Sánchez Uría J.E., Sanz-Medel A., *Talanta*, 1998, 47, 509.
- <sup>70</sup> Alli A., Jaffé R., Jones R., *J. High Resol. Chromatogr.*, 1994, 17, 745.
- <sup>71</sup> O'Reilly J.E., *J. Chromatogr.*, 1982, 238, 433.
- <sup>72</sup> Bulska E., Baxter D.C., Frech W., *Anal. Chim. Acta*, 1991, 249, 545.
- <sup>73</sup> Sanz J., De Diego A., Raposos J.C., Madariaga J.M., *Anal. Chim. Acta*, 2003, 486, 255.
- <sup>74</sup> Emteborg H., Snell J., Qian J., Frech W., *Chemosphere*, 1999, 39(7), 1137.
- <sup>75</sup> Gómez-Ariza J.L., Lorenzo F., García-Barrera T., Sánchez-Rodas D., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 511, 165.
- <sup>76</sup> Muñoz J., Gallego M., Valcárcel M., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1055, 185.
- <sup>77</sup> Bouyssiere B., Baco F., Savary L., Lobinski R., *J. Chromatogr. A*, 2002, 976, 431.
- <sup>78</sup> Rosenkraz B., Bettmer J., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 373, 461.
- <sup>79</sup> Carpinteiro Botana J., Rodríguez Rodil R., Cano Díaz A.M., Lorenzo Ferreira R.A., Cela Torrijos R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 904.
- <sup>80</sup> Rodríguez I., Mounicou S., Lobinski R., Sidelnikow V., Patrushev Y., Yumanaka M., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 4534.
- <sup>81</sup> Jones R.D., Jacobson M. E., Jaffe R., West-Thomas J., Arfstrom C., Alli A., *Water, Air and Soil Pollution*, 1995, 80, 1285.
- <sup>82</sup> Ebdon L., Foulkes M.E., Le Roux S., Muñoz-Olivas R., *Analyst*, 2002, 127, 1108.
- <sup>83</sup> Cai Y., Jaffé R., Alli A., Jones R., *Anal. Chim. Acta*, 1996, 334, 251.
- <sup>84</sup> Cai Y., Jaffé R., Jones R., *Environmental Science & Technology*, 1997, 31(1), 302.
- <sup>85</sup> Horvat M., Liang L., Bloom N.S., *Anal. Chim. Acta*, 1993, 281, 135.



- <sup>86</sup> Cai Y., Monsalud S., Jaffé R., Jones R.D., *J. Chromatogr. A*, 2000, 876, 147.
- <sup>87</sup> Mondral B.C., Das D., Das A.K., *Anal. Chim. Acta.*, 2001, 450, 223.
- <sup>88</sup> Cela R., *Environ. Technol.*, 1992, 13, 11.
- <sup>89</sup> Liu R., *Environ. Pollut.*, 2003, 124, 39.
- <sup>90</sup> Longbottom J.E., Dressman R.C., *Chromatogr. Newslett.*, 1973, 2, 17.
- <sup>91</sup> Emteborg H., Sinemus H.W., Radziuk B., Baxter D.C., Frech W., *Spectrochim. Acta Part B*, 1996, 51(8), 829.
- <sup>92</sup> Horvat M., Liang L., Bloom N.S., *Anal. Chim. Acta*, 1993, 282, 153.
- <sup>93</sup> Fischer R., Rapsomanikis R., Andrae M.O., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 763.
- <sup>94</sup> Armstrong L., Corns W.T., Stockwell P.B., O'Connor G., Ebdon L., Evans E.H., *Anal. Chim. Acta*, 1999, 390, 245.
- <sup>95</sup> Grossman W.E.L, Eng J., Tong Y.C., *Anal. Chim. Acta*, 1972, 60, 447.
- <sup>96</sup> Quimby B.D., Uden P.C., Barnes R.M., *Anal. Chem.*, 1986, 58, 35.
- <sup>97</sup> Quian J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2002, 367, 457.
- <sup>98</sup> Snell J. Quian J., Johansson M., Smit K., Frech W., *Analyst*, 1998, 123, 905.
- <sup>99</sup> Quevauviller P., Filippelli M., Horvat M., *Trends Anal. Chem.*, 2000, 19(2+3), 157.
- <sup>100</sup> García Alonso J.I., Ruíz Encinar J., Muñiz C.S., Gayón J.M.M., Sanz-Medel A., *Plasma Source Mass Spectrometry: The New Millenium*, 2001, p. 327. Holland G., Tanner D. (Eds.) Cambridge, Reino Unido.
- <sup>101</sup> Tseng C.M., De Diego A., Martin F.M., Donard O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 629.
- <sup>102</sup> Harrington C.F., *Trends Anal. Chem.*, 2000, 19(2+3), 167.
- <sup>103</sup> Wilken R.D., Hintelmann H., *Water, Air and Soil Pollut.*, 1991, 56, 427.
- <sup>104</sup> Sánchez D.M., Martín R., Morante R., Marín J., Munuera M.L., *Talanta*, 2000, 52, 671.
- <sup>105</sup> Eiden R., Falter R., Agustin-Castro B., Shöler H.F., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 357, 439.
- <sup>106</sup> Río-Segade S., Bendicho C., *Talanta*, 1999, 48, 477.
- <sup>107</sup> Hintelmann H., Wilken R.D., *Sci. Total Environ.*, 1995, 166, 1.
- <sup>108</sup> Falter R., Ilgen G., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 358, 401.
- <sup>109</sup> Hintelmann H., Hempel M., Wilken R.D., *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 1845.
- <sup>110</sup> Bramanti E., Lomonte C., Onor M., Zamboni R., D'Ulivo A., Raspi G., *Talanta*, 2005, en prensa.
- <sup>111</sup> Liang L.N., Jiang G.B, Liu J.F., Hu J.T, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 477, 131.
- <sup>112</sup> Tu W., Johnson W., Buckley B, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18(7), 696.
- <sup>113</sup> Chiou C.S., Jiang S.J., Danadurai K.S.K., *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, 1133.
- <sup>114</sup> Falter R., Ilgen G., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 358, 407.
- <sup>115</sup> Falter R., Schöler H.F., *J. Chromatogr. A*, 1994, 675, 253.
- <sup>116</sup> Falter R., Schöler H.F., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, 35, 34.

- <sup>117</sup> Ramalhosa E., Río-Segade S., Pereira E., Vale C., Duarte A., *Anal. Chim. Acta*, 2001, 448, 135.
- <sup>118</sup> Stockwell P.B., Corns W.T., Bryce D.W., 2000, p.1840. Pittcon®, Abstracts.
- <sup>119</sup> Schickling C., Broekaert J.A.C., *Appl. Organomet. Chem.*, 1995, 9, 29.
- <sup>120</sup> Palmisano F., Zambonin P.G., Cardellicchio, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1993, 346, 648.
- <sup>121</sup> Gaston Wu J.C., *Spectrosc. Lett.*, 1991, 24, 681.
- <sup>122</sup> Hintelmann H., Wilken R.D., *Appl. Organomet. Chem.*, 1993, 7, 173.
- <sup>123</sup> Costa-Fernández J., Lunzer F., Pereiro-García R., Sanz-Medel A., Bordel-García N.J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, 10, 1019.
- <sup>124</sup> Munaf E., Haraguchi H., Ishii D., Takeuchi T., Goto M., *Anal. Chim. Acta*, 1990, 235, 399.
- <sup>125</sup> Bushee D.S., *Analyst*, 1988, 113, 1167.
- <sup>126</sup> Shum S.C.K., Pang H.M., Houk R.S., *Anal. Chem.*, 1992, 64, 2444.
- <sup>127</sup> Martínez R., Tagle M., Sánchez J.E., Sanz-Medel A., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 419, 137.
- <sup>128</sup> Dabek-Zlotorzynska E., Lai E.P.C., Timerbaev A.R., *Anal. Chim. Acta*, 1998, 359, 1.
- <sup>129</sup> Carro-Díaz A.M., Lorenzo-Ferreira R.A., Cela-Torrijos R., *J. Chromatogr. A*, 1996, 730, 345.
- <sup>130</sup> Lee T.H., Jiang S.J., *Anal. Chim. Acta.*, 2000, 413, 197.
- <sup>131</sup> Silva da Rocha M., Soldado A.B., Blanco-González E, Sanz-Medel A, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15, 513. Silva M., Soldado A.B., Blanco-González E., Sanz-Medel J. *Anal. At. Spectrom.*,
- <sup>132</sup> Silva da Rocha M., Soldado A.B., Blanco E, Sanz-Medel A, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 951.
- <sup>133</sup> Morita H., Sugimoto M., Shimomura S., *Anal. Sci.*, 1990, 6, 91.
- <sup>134</sup> Cossa D., Sanjuan J., Cloud J., Stockwell P.B., Toms W.T., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, 10, 287.
- <sup>135</sup> Río-Segade S., Bendicho C, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1999, 42, 245.
- <sup>136</sup> Río-Segade S., Bendicho C., *Spectrochim. Acta Part B*, 1999, 54, 1129.
- <sup>137</sup> Rezende M.C.R., Campos R.C., Curtius A.J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, 8, 247.
- <sup>138</sup> Morabito R., *Fresenius Anal. Chem.*, 1995, 351, 378.
- <sup>139</sup> Ruiz Encinar J., Ruzik R., Buchmann W., Tortajada J., Lobinski R., Szpunar J., *Analyst*, 2003, 128, 220.
- <sup>140</sup> McSheehy S., Yang W., Pannier F., Szpunar J., Lobinski R., Auger J., Potin-Gautier M., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 421, 147.
- <sup>141</sup> McSheehy S., Pohl P., Szpunar J., Potin-Gautier M., Lobinski R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 68.
- <sup>142</sup> Işcioğlu B., Henden E., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 505, 101.
- <sup>143</sup> Dernovics M., Stefánka Zs., Fodor P., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 372, 473.

- <sup>144</sup> Stefánka Z., Ipolyi I., Dernovics M., Fodor P., *Talanta*, 2001, 55, 437.
- <sup>145</sup> Ferri T., Coccioli F., De Luca C., Callegari C.M., Morabito R., *Microchem. J.*, 2004, 78, 195.
- <sup>146</sup> Lobinski R., Szpunar J., *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3765.
- <sup>147</sup> Polatajko A., Śliwka-Kaszyńska M., Dernovics M., Ruzik R., Ruiz Encinar J., Szpunar J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 114.
- <sup>148</sup> Slejkovec Z., Elteren J., Woroniecka U.D., Kroon K.J., Falnoga I., Byrne A.R., *Biol. Trace. Elem. Reserach*, 2000, 75, 139.
- <sup>149</sup> Önning G., Bergdahl I.A., *Analyst*, 1999, 124, 1435.
- <sup>150</sup> Roberge M.T., Borgerding A., Finley J.W., *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 4191.
- <sup>151</sup> Emteborg H., Bordin G., Rodriguez A.R., *Analyst*, 1998, 123, 245.
- <sup>152</sup> Jakubowski N., Thomas C., Klueppel D., Stuewer D., *Analisis Magazine*, 1998, 26(6), 37.
- <sup>153</sup> Alsing Pedersen G., Larsen E.H., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 358, 591.
- <sup>154</sup> Martin J.L., Gerlach M.L., *Anal. Biochem.*, 1969, 29, 257.
- <sup>155</sup> Potin-Gautier M., Boucharat C., Astruc A., Astruc M., *Appl. Organomet. Chem.*, 1993, 7, 593.
- <sup>156</sup> Wróbel K., Dannamkumarath S.S., Caruso J.A., Wysocka I.A., Bulska E., Świątek J., Wierzbicka M., *Food Chem.*, 2004, 86(4), 617.
- <sup>157</sup> Gómez-Ariza J.L., Caro de la Torre M.A., Giráldez I., Morales E., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 524, 305.
- <sup>158</sup> Larsen H.E., Hansen M., Fan T., Vahl M., *J. Anal. At. Spectrom*, 2001, 16, 1403.
- <sup>159</sup> Devos C., Sandra K., Sandra P., *J. Pharm, Biomed. Anal.*, 2002, 27, 507.
- <sup>160</sup> Potin-Gautier M., Gilon N., Astruc M., De Gregori I., Pinochet H., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 1997, 67, 15.
- <sup>161</sup> Michalke B., Witte H., Schramel P., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 372, 444.
- <sup>162</sup> Ge H., Cai X.J., Tyson J.F., Uden P.C., Denoyer E.R., Block E., *Anal. Comm.*, 1996, 33, 279.
- <sup>163</sup> Kannamkumarath S.S., Wrobel K., Wrobel K., Vonderheide A., Caruso J.A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 373, 454.
- <sup>164</sup> Beilstein M.A., Tripp M.J., Whanger P.D., *J. Inor. Biochem.*, 1981, 15, 339.
- <sup>165</sup> Evenson J.K., Sunde R.A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1988, 187, 169.
- <sup>166</sup> Moreno P., Quijano M.A., Gutiérrez A.M., Pérez-Conde M.C., Cámara C., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 315.
- <sup>167</sup> Carvalli S., Cardellicchio N., *J. Chromatogr. A*, 1995, 706, 429.
- <sup>168</sup> Hirs C.H.W, Stein W.H., Moore S., *J. Biol. Chem.*, 1954, 211, 941.
- <sup>169</sup> Moore S., Spackman D.H., Stein W.H., *Anal. Chem.*, 1958, 30, 1185.

- <sup>170</sup> Sochaski M.A., Jenkins A.J., Lyons T.J., Thorpe S.R., Baynes J.W., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 4662.
- <sup>171</sup> Broderick D.J., Beilstein M.A., Whanger P.D., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 1985, 44, 1509.
- <sup>172</sup> Palacios M.A., Varga A., Gómez M., Cámara C., Gavilanes F., *Quím. Anal.*, 1999, 18, 163.
- <sup>173</sup> Hamel C., Kyriakopoulos A., Rösick U., Behne D., *Analyst*, 1997, 122, 1359.
- <sup>174</sup> Kroll J., Rawel H., Krock R., *Z. Lebensm Unters Forsh A*, 1998, 207, 202.
- <sup>175</sup> Simpson R.J., Neuberger M.R., Liu T.Y., *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 1936.
- <sup>176</sup> Chiou S.H., Wang K.T., *J. Chromatogr. A*, 1988, 448, 404.
- <sup>177</sup> Wrobel K., Kannamkumarath S.S., Wrobel K., Caruso J.A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 375, 133.
- <sup>178</sup> De la Calle-Guntiñas M.B., Brunori C., Scerbo R., Chiavarini S., Quevauvillier P., Adams F.C., Morabito R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 1041.
- <sup>179</sup> Chassaigne H., Chéry C.C., Bordin G., Rodríguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 2002, 409.
- <sup>180</sup> Bermejo-Barrera P., Fernández-Nocelo S., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 1893.
- <sup>181</sup> Larsen E.H., Sloth J., Hansen M., Moesgaard S., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 310.
- <sup>182</sup> Uden P.C., Boakye H.T., Kahakachchi C., Hafezi R., Nolibos P., Block E., Johnson S., Tyson J.F., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 65.
- <sup>183</sup> Suzuki K.T., Kurasaki K., Okazaki N., Ogra Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, en prensa.
- <sup>184</sup> Quijano M.A., Moreno P., Gutiérrez A.M., Pérez-Conde M.C., Cámara C., *J. Mass Spectrom.*, 2000, 35, 878.
- <sup>185</sup> Vonderheide A.P., Wrobel K., Kannamkumarath S.S., B'Hymer C., Montes Bayón M., Ponce de León C., Caruso J.A., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5722.
- <sup>186</sup> Moreno P., Gutiérrez A.M., Pérez-Conde M.C., Cámara C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 1044.
- <sup>187</sup> Gómez-Ariza J.L., Bernal-Daza V., Villegas-Portero M.J., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 520, 229.
- <sup>188</sup> Díaz Huerta V., Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 644.
- <sup>189</sup> Díaz Huerta V., Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J.M., Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 1243.
- <sup>190</sup> Ruiz Encinar J., Śliwka-Kaszyńska M., Polatajko A., Vacchina V., Szpunar J., *Anal. Chim. Acta*, 2003, 500, 171.
- <sup>191</sup> Crews H.M., Clarke P.A., Lewis D.J., Owen L.M., Strutt P.R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 11, 1177.

- <sup>192</sup> Sutton K., Richard M.C., Sutton M.C., Caruso J.A., *J. Cromatogr. A*, 1997, 789, 85.
- <sup>193</sup> Sutton K.L., Ponce de León C.A., Ackley K., Sutton R.M.C., Stalcup A.M., Caruso J.A., *Analyst*, 2000, 125, 281.
- <sup>194</sup> Ponce de León C.A., Sutton K.L., Caruso J.A., Uden P.C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15, 1103.
- <sup>195</sup> Michalke B., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 2003, 56, 122.
- <sup>196</sup> Li F., Goessler W., Irgolic K.J., *J. Chromatogr. A*, 1999, 830, 337.
- <sup>197</sup> Uden P.C., Boakye H.T., Kahajachchi C., Tyson J.F., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1050, 85.
- <sup>198</sup> González La Fuente J.M, Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, 11, 1163.
- <sup>199</sup> Bird S.M., Ge H., Uden P.C., Tyson J.F., Block E, Denoyer E.J., *J. Chromatogr. A*, 1997, 789, 349.
- <sup>200</sup> Kotrebai M., Tyson J.F., Block E., Uden P.C., *J. Chromatogr. A*, 2000, 866, 51.
- <sup>201</sup> Kajander E.O., Pajula R.L., Harvima R.J., Elorata T.O., *Anal. Biochem.*, 1989, 179, 396.
- <sup>202</sup> Gónzález La Fuente J.M., Alaska M., Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 423.
- <sup>203</sup> Daun C., Lundh T., Önnign G., Åkesson B., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 129.
- <sup>204</sup> Mounicou S., Meija J., Caruso J., *Analyst*, 2004, 129, 116.
- <sup>205</sup> Koplík R., Bordová M., Mestek O., Komínková J., Suchánek M., *J. Chromatogr. B*, 2002, 775, 179.
- <sup>206</sup> Kannamkumarath S.S., Wrobel K., Wuilloud R.G., *Talanta*, 2005, 66(1), 153.
- <sup>207</sup> De la Flor St.Remy R., Fernández Sánchez M.L., López Sastre J.B., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 1104.
- <sup>208</sup> Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J.M., García Alonso J.I., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 1210.
- <sup>209</sup> Koyama H., Amura A., Ejima A., Kasanuma Y., Watanabe C., Satoh H., *Anal. Biochem.*, 1999, 267, 84.
- <sup>210</sup> Méndez S.P., González E.B., Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 893.
- <sup>211</sup> Méndez S.P., Bayon M.M., González E.B., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15, 1109.
- <sup>212</sup> Bendahl L., Gammelgaard B., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 950.
- <sup>213</sup> Dumont E., De Cremer K., Van Hulle M., Chéry C.C., Vanhaecke F., Cornelis R., *J. Chromatogr. A*, 2005, 1071(1-2), 191.
- <sup>214</sup> Chatterjee A., Shibata Y., Morita M., *Michochem. J.*, 2001, 69, 179.
- <sup>215</sup> Viñas P., López-García I., Merino-Meroño B., Campillo N., Hernández-Córdoba M., *Anal. Chim. Acta*, 2005, 535, 49.
- <sup>216</sup> Mester Z., Fodor P., *Anal. Chim. Acta*, 1999, 386, 89.

- <sup>217</sup> Woller A., Garraud H., Boisson J., Dorthe A.M., Fodor P., Donard O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 141.
- <sup>218</sup> Wang L., May S.W., Browner R.F., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, 11, 1137.
- <sup>219</sup> Jakubowski N., Thomas C., Stuewer D., Dettlaff I., Schram J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, 11, 1023.
- <sup>220</sup> Cai X., Uden P.C., Sullivan J.J., Quimby B.D., Block E., *Anal. Proc.*, 1994, 31, 325.
- <sup>221</sup> Dietz C., Sanz Landaluce J., Ximénez-Embún P., Madrid-Albarrán Y., Cámara C., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 501, 157.
- <sup>222</sup> Johansson K., Örnemark U., Olin A., *Anal. Chim. Acta*, 1993, 274, 129.
- <sup>223</sup> Harrison R.M., Rap Somaniks S., *Environmental Analysis using Chromatographic Interfaced with Atomic Spectrometry*, 1989, pp 318-341. Ellis Horwood Limited, Publishers Chichester (Ed). New York.
- <sup>224</sup> Dauchy X., Potin-Gautier M., Astruc A., Astruc M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, 348, 792.
- <sup>225</sup> Gómez Ariza J.L., Pozas J.A., Giradlez I., Morales E., *J. Chromatogr. A*, 1998, 823, 259.
- <sup>226</sup> Dietz C., Sanz Landaluce J., Ximénez-Embún P., Madrid-Albarrán Y., Cámara C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 260.
- <sup>227</sup> Janák J., Billiet H.A.H., Fank J., Luyben K., Husek P., *J. Chromatogr. A*, 1994, 677, 192.
- <sup>228</sup> Montes-Bayón M., LeDuc D.L., Terry N., Caruso J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 872.
- <sup>229</sup> Pérez Méndez S., Montes Bayón M., Blanco González E., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 1333.
- <sup>230</sup> Albert M., Demesmay C., Rocca J.L., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, 351, 426.
- <sup>231</sup> Ng C.L., Lee H.K., Li S.F., *J. Chromatogr.*, 1993, 652, 547.
- <sup>232</sup> Chen W.H., Lin S.Y., Liu C.Y., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 410, 25.
- <sup>233</sup> Magnuson M.L., Creed J.T., Brockhoff C.A., *Analyst*, 1997, 122, 1057.

# Parte Experimental

**PROCESOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA  
EXTRACCIÓN DE Hg, Se Y SUS ESPECIES EN MUESTRA  
DE INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL**

Capítulo V



## **CAPITULO V: PROCESOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE Hg, Se Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL**

---

**1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE MERCURIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE PESCADO Y POSTERIOR DETECCIÓN CON FI-CV-AFS Y GC-PYRO-AFS**

**2. EXTRACCIÓN DE SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE EL USO DE LA SONDA DE ULTRASONIDOS Y POSTERIOR DETECCIÓN CON ICP-MS Y HPLC-ICP-MS**

---

La elevada toxicidad de las diferentes formas químicas del mercurio y su baja concentración en muestras biológicas hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan su separación, identificación y cuantificación en este tipo de matrices.

Por otro lado, el interés creciente que suscita la determinación de las distintas formas químicas de selenio en muestras biológicas, y la baja concentración de las mismas, pone de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos fiables para su determinación y especiación.

La preparación de la muestra es una etapa crucial en los estudios de especiación, ya que idealmente debe extraer cuantitativamente las especies preservando la integridad de las mismas.

Por ello, el objetivo de este capítulo fue desarrollar procedimientos de tratamiento de muestra para la determinación de mercurio y selenio total y sus especies en muestras biológicas. Las metodologías desarrolladas y los resultados obtenidos se recogen en las dos publicaciones que se presentan a continuación.

En el primer trabajo (sección 1) **“Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples”** (*J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 1595-1601) se abordó la puesta a punto de un procedimiento de tratamiento de muestra reproducible y eficaz que asegure la integridad de las especies de mercurio presentes en muestras de pescado. El procedimiento analítico descrito se basa en el secado previo de la muestra, la extracción del mercurio y sus especies, y la determinación de las mismas sin que se altere su concentración y composición original.

En el trabajo se evaluaron los posibles riesgos asociados a la etapa de secado mediante tres tratamientos distintos (secado en estufa, microondas y liofilización) y la extracción del mercurio empleando cuatro medios de extracción diferentes (HCl, NaOH, TMAH y SDS). Para minimizar las desventajas de los procedimientos de extracción convencionales esta se llevó a cabo en un baño de ultrasonidos, optimizándose la concentración y el volumen del agente extractante, así como, el tiempo de exposición a la sonicación. La determinación del contenido total de mercurio se realizó mediante la técnica CV-AFS.

Posteriormente se evaluó la estabilidad de los extractos durante una semana a temperatura ambiente y la integridad de las especies extraídas. Para ello se aplicaron las técnicas de CV-AFS y GC-AFS. La posible formación artificial de la especie dimetilmercurio durante los procesos de extracción propuestos se evaluó tanto en las muestras como con los patrones.

La metodología desarrollada se validó mediante su aplicación a un material de referencia certificado en MeHg (BCR 463, atún).

En la segunda publicación (sección 2) **“Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis”** (*Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 373-379) se presenta un método rápido, sencillo y novedoso para la extracción de selenio total y de sus especies en muestras de interés nutricional, mediante la acción conjunta de una enzima no específica (*Streptomyces Griseus*) y la energía de ultrasonidos producida por una sonda. El procedimiento analítico descrito se basa en una hidrólisis enzimática en la que el tiempo de incubación y control de temperatura, parámetros críticos en cualquiera de los procesos en los que intervengan enzimas, se modifican sensiblemente si se compara con procedimientos convencionales, como consecuencia de la energía ultrasónica.

En el trabajo se estudian distintos medios de extracción y se optimizan diversos parámetros que afectan a la eficiencia de extracción del selenio: tiempo de sonicación, temperatura, relación de masa sustrato/enzima, amplitud del ultrasonido y cantidad de muestra. El procedimiento se aplicó a tres muestras de origen animal (músculo, hígado y riñón de pollo) y una vegetal (pienso).

La separación se realizó empleando una columna de intercambio catiónico (PRP-X200) y formiato de pridina como fase móvil a dos pHs distintos. La identificación y cuantificación de las especies de selenio presentes en las muestras se llevó a cabo mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS, monitorizando los isótopos  $^{82}\text{Se}$  y  $^{78}\text{Se}$ .

También se evaluó la estabilidad del contenido de selenio total y de sus especies, en las disoluciones resultantes, durante 48 horas y a temperatura ambiente.

La metodología propuesta se validó mediante comparación de los resultados obtenidos con los resultados de un método enzimático previamente desarrollado (debido a la ausencia de material de referencia certificado en especies) como con un material de referencia certificado en Se total (CRM 278, mejillón).

**1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE MERCURIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE PESCADO Y POSTERIOR DETECCIÓN CON FI-CV-AFS Y GC-PYRO-AFS.**

A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara.

“Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples”.

***J. Anal. At. Spectrom.***, 2002, 17, 1595-1601.

El trabajo completo se presentó como póster y comunicación oral en la “XVIII Reunión Nacional de Espectroscopia”, Coimbra, Portugal. 16-21 de Septiembre 2002.

## Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples

Ana Isabel Cabañero Ortiz, Yolanda Madrid Albarrán and Carmen Cámara Rica\*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n., 28040 Madrid, Spain.  
E-mail: ccamara@quim.ucm.es

Received 25th May 2002, Accepted 15th October 2002

First published as an Advance Article on the web 28th October 2002

Investigations are described to select the most suitable drying and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. The criteria for selection were good recovery and preservation of the original species information. Three different drying techniques were evaluated: oven-dried, microwave oven-dried and freeze-dried. Best results were obtained when oven-dried, but microwave dried or freeze-dried showed mercury losses. The four extraction methods investigated were: HCl leaching, alkaline-methanol extraction with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and with KOH, and sodium dodecyl sulfate (SDS) extraction. The extraction efficiency was determined by comparing the total amount of mercury in the samples after microwave digestion with the amount extracted by the different methods described. Mercury measurements were carried out by flow injection-cold vapour-atomic fluorescence spectrometry (FI-CV-AFS). Quantitative mercury extraction was only achieved with HCl leaching (97%). Species integrity after extraction was evaluated by investigating the extracts with capillary gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. Artificial formation of dimethylmercury occurs when TMAH is used as extractant. HCl leaching-GC-AFS was finally applied to methylmercury determination in tuna fish and swordfish samples, and gave results in the range 0.78–1.93 mg kg<sup>-1</sup>. The detection limit for monomethylmercury (MMHg) was found to be 1.2 pg.

### Introduction

Among all the heavy metals, mercury (Hg) has become one of the subjects of most concern due to its potential accumulation and toxic effects to aquatic organisms and human health.<sup>1</sup>

Mercury contamination may occur as a result of natural geochemical and/or anthropogenic sources.<sup>2</sup> Anthropogenic sources of mercury come from metal production, chlorine-alkali and pulp industries, waste handling and treatment, and coal, peat and wood burning.<sup>3</sup> Natural inputs to the atmosphere include degassing and wind entrainment of dust particles from land, notably from mercuriferous areas, volcanic eruptions, forest fires, biogenic emissions of volatile and particulate compounds, and degassing from water surfaces.<sup>4</sup>

Elemental mercury is efficiently transported as a gas around the globe, and even remote areas show evidence of mercury pollution originating from industrial sources. Besides elemental mercury, the major forms of mercury in water are ionic mercury (which is bound to chloride, sulfide or organic acids) and organic mercury, particularly methylmercury.<sup>5</sup> Organic mercury compounds are of special concern because of their easy penetration through biological membranes, efficient bioaccumulation, high stability and long term elimination from tissues.<sup>6</sup> Therefore alkylmercury compounds are by far the most toxic ones.

Methylmercury is the most commonly occurring organomercury compound, and is recognised as a major environmental pollution issue and health hazard for humans.<sup>7</sup> Anthropogenic emission of methylmercury is generally rare, but it is formed in aquatic sediments and anoxic waters as a result of the methylating activity of sulfate reducing bacteria. Most methylmercury so formed is introduced into biological material by rapidly accumulating in phytoplankton cytoplasm because of its high affinity for sulfhydryl groups and lipids, afterwards zooplankton digest dissolved cytoplasm and Hg-rich suspended particles.<sup>1,7</sup> Further efficient transfer of

methylmercury through higher levels of the food chain seems to result from the lipid solubility of CH<sub>3</sub>HgCl, which allows it to be partly retained in the fatty tissue of animals. In fish, however, the MMHg burden in muscle tissue is more important than in lipids, clearly showing that bioaccumulation cannot be explained solely by MMHg liposolubility. In the case of fish, there seems to be a high specificity of the intestine wall toward MMHg absorption. In contrast, inorganic Hg is absorbed at the microvilli interface, resulting in a very low uptake rate.<sup>8</sup> As a result, the average proportion of MMHg over total Hg increases from about 10% in the water column to 15% in phytoplankton, 30% in zooplankton, and 95% in fish<sup>9</sup> and consequently, accumulation of mercury in aquatic organisms, mainly methylmercury, occurs with concurrent bioamplification phenomena through the tropic chain.

Contaminated food is the major route of exposure for humans to methylmercury. Once ingested, an estimated 95% of methylmercury is absorbed from the gastrointestinal tract into the blood. Kidney damage, cardiovascular collapse and death may occur if 10–60 mg CH<sub>3</sub>Hg kg<sup>-1</sup> is consumed in a short period of time, while neurotoxicity results when smaller concentrations of methylmercury are absorbed over a long period of time.<sup>10</sup> Therefore, it is necessary to develop rapid, sensitive and accurate methods for the extraction, separation, identification and quantification of organomercury species.

The sample pre-treatment step is usually the most labour intensive part of the analytical method. Indeed, the physical treatment of the sample (*e.g.* grinding to decrease particle size, drying to eliminate the water, exposure to changes in ambient temperature or daylight) may give rise to losses of volatile analyte components.<sup>11</sup>

Otherwise, sample preparation for the extraction and separation of organomercury compounds is one of the most critical steps. Many of the methods used are based on liquid-liquid extraction,<sup>12</sup> steam distillation,<sup>13</sup> solid-phase extraction,<sup>14,15</sup> headspace solid-phase microextraction<sup>16</sup> or supercritical fluid

extraction. Most common drawbacks of these methods are the laboriousness of the procedures, high cost of the equipment, risks of interferences and high solvent consumption.<sup>12</sup>

The analytical technique most commonly used for determination of organomercury compounds is gas chromatography using electron capture detection (GC-ECD), with or without previous derivatization of the mercury compounds. Other techniques involve derivatization by butylation, aqueous phase ethylation or hydridization, coupled with microwave-induced plasma-atomic emission detection (MIP-AES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), atomic absorption (AAS), or more recently, with atomic fluorescence (AFS) detection, as an alternative technique which offers high sensitivity and selectivity.<sup>12</sup>

Very recently surprising discoveries have reported that inorganic mercury present in the samples may be accidentally converted into MMHg during sample preparation due to artifactual or accidental formation of methylmercury during sample extraction, derivatization and separation.<sup>17-20</sup> The extent of the methylation varies with the matrix and sample treatment. This leads to the conclusion that MMHg levels determined in samples may have been overestimated in the past and therefore it constitutes a source of error that should be studied and minimised.

In this paper the performance of different analytical procedures for sample pre-treatment and mercury extraction for mercury speciation in fish samples was evaluated. Sample pre-treatment was carried out employing three sample drying treatments: oven dried, microwave-oven dried and freeze-dried. The extraction methods tested were based on: alkaline extraction with KOH/MeOH and TMAH/MeOH, acid leaching with HCl and extraction with SDS. The identification and determination of inorganic mercury and organic mercury was achieved without and with previous chromatographic separations steps. In the former, quantification of methylmercury was achieved by separately determining total and inorganic mercury with FI-CV-AFS by the use of selective reduction with stannous chloride. In the latter, the separation of mercury species was carried out by capillary gas chromatography using atomic fluorescence spectrometry as detector *via* a pyrolysis oven.

The extraction recoveries and possible overestimation of an organomercury compound because of the risk of unintended methylation of inorganic or organic mercury during sample preparation, was also evaluated.

## Experimental

### Reagents and samples

All reagents were of analytical grade and high purity. Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA) was used in all experiments. Standard mercury solutions were prepared by appropriate dilution of a stock mercury(II) solution (1000 mg L<sup>-1</sup>; Merck). Standard stock solutions of 1000 mg L<sup>-1</sup> of methylmercury chloride, dimethylmercury (DMHg) and ethylmercury (EtHg) chloride (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) were prepared by dissolving appropriate amounts in methanol (HPLC grade, Scharlau). These solutions were stored in amber vials at -18 °C and diluted with methylene chloride (HPLC grade, Scharlau) to obtain working standards or spiking standards. Standards were prepared daily to reduce mercury volatilisation from standards.

Stannous chloride (3% w/v) used as a reducing agent was prepared by dissolving the appropriate mass of stannous chloride dehydrate (Merck, Darmstadt, Germany) in concentrated hydrochloric acid and diluting to volume with ultra-pure water. The hydrochloric acid concentration in the reducing agent was 3 mol L<sup>-1</sup>. Hydrochloric acid solution (3 mol L<sup>-1</sup>) was prepared by appropriate dilution of concentrated hydrochloric

acid (12 mol L<sup>-1</sup>; Merck). Reagent solutions for the reduction were prepared weekly to reduce hydrolysis of SnCl<sub>2</sub> and maintain the efficiency of Hg<sup>2+</sup> reduction.

For the sample extraction procedures methanolic tetramethylammonium hydroxide (25% w/v), methanolic potassium hydroxide (25% w/v) and SDS were obtained from Merck.

An acidified solution of potassium bromide (18% m/v in 0.5% v/v sulfuric acid; Scharlau), 1 mol L<sup>-1</sup> copper(II) sulfate, and 0.01 mol L<sup>-1</sup> sodium thiosulfate were used.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) pro analysis grade (distilled in our laboratory in a distillation system for acids, Model BSB 9391R, Berghof, Germany) were used to digest the samples.

Helium C-50 was used as a carrier gas and Argon C-50 was used as a make-up gas and sheath gas at the transfer line and the AFS, respectively (Carburos Metálicos, Spain).

Fish samples: swordfish, sardine and tuna were obtained from Spain and Portugal food markets and transported to the laboratory in an ice compartment. The samples were homogenised, frozen and dried under different procedures. The resulting samples were ground, homogenised and kept at -18 °C until use.

The reference material CRM-463, certified for methylmercury (2.85 ± 0.16 µg g<sup>-1</sup>), from the former Community Bureau of Reference of European Commission (BCR), which is a tuna fish, was used for method validation. The certified reference materials were used as provided.

### Apparatus

An atomic fluorescence spectrometer, AFS (Merlin 10.023, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) equipped with a high intensity mercury lamp source, a collimator, a multi reflectance filter and a solar blind photo multiplier tube placed at 90° to the incident light, was used to determine the total mercury content. The spectrometer has a reference cell to check lamp emission. The measurements were performed in ratio mode, which is a compensation mode between the emission and reference cell readings as internal baseline correction. In the AFS, a sheath gas was used in order to achieve an optimum conformation of the mercury vapour at the excitation cell. An activated carbon trap was placed at the spectrometer exit.

Mercury vapour was generated in a flow injection system consisting of a peristaltic pump (Gilson, Villiers-le-Bel, France) and a six-way injection valve (Omnifit, Cambridge, UK). Also, polytetrafluoroethylene (PTFE) tubes (id 0.6 mm) and Omnifit connectors were used to build the manifold. The vapour was generated using SnCl<sub>2</sub> and HCl and the system was purged with argon from a gas-liquid separator. The separator was coupled to a commercial dryer membrane (Perma Pure Products, Monmouth Airport, Farmingdale, NJ, USA) to eliminate the moisture, and both together were used as an interface of CV-AFS.

The speciation of organomercury compounds was carried out by gas chromatography atomic fluorescence spectrometry (GC-AFS). A schematic diagram of the GC-AFS system used in this work is shown in Fig. 1. Separation of organomercury compounds was carried out in a PerkinElmer gas chromatograph (Model 8410) with an on-column injector. The chromatograph was fitted with a non-polar capillary fused silica column SGL-1 (15 m × 0.53 mm id) coated with 1.5 µm dimethylpolysiloxane (Sugelabor S.A., Spain). Fused silica press-fit connectors (OHIO Valley Speciality chemical, Marietta, OH, USA), at the beginning and at the end of the column, were used to link deactivated silica capillary tubes of 35 and 65 cm length, respectively. The first gap was used to preserve the life of the column and the second one to interface the GC and detection system, leading the eluted species from the chromatograph column through a pyrolysis oven to the detector.

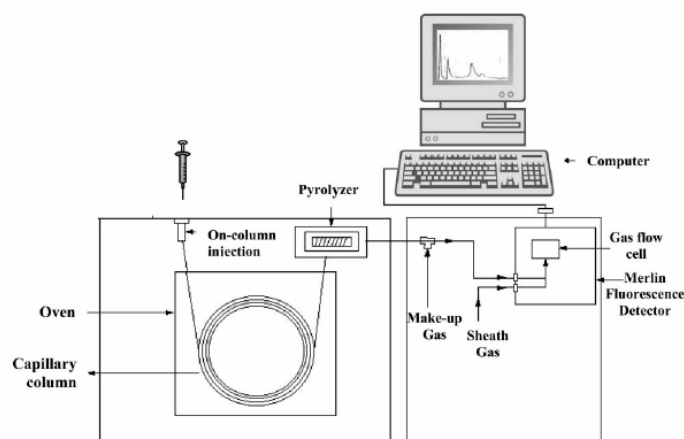


Fig. 1 Coupling GC-AFS via pyrolyzer and transfer line for organomercury speciation.

A syringe (Hamilton 0–5  $\mu\text{L}$ ) with a 7 cm needle was used to inject standards and samples into the GC.

A pyrolyzer unit 10.558 (P.S. Analytical, Kent, UK) with a temperature control module was used as interface between GC and AFS in order to break down the compounds to atomic mercury vapour. Then, it was led to the AFS through a 20 cm long deactivated silica capillary tube in which a T-connection was placed to incorporate a make up gas in order to improve the transport efficiency. The detection was achieved with the atomic fluorescence spectrometer mentioned above.

The samples were grounded in a blender (Schott Iberica S.A, Barcelona, Spain) and dried in an oven, a domestic microwave oven (LG, 850 W maximum output) and a Telstar Crio 2 lyophilizator. Ultrasonic extraction was performed using a Selectra ultrasonic bath.

An automatic shaker (Griffin) and an Eppendorf (Hamburg, Germany) Centrifuge 5804, F34-6-38, were also employed for sample preparation.

For total Hg determination samples were digested in double-walled advanced composite vessels using a 1000 W MSP (Microwave Sample Preparation System) microwave oven (CEM, Mattheus, NC, USA).

#### Sample preparation processes

**Drying procedures.** Different methods of sample drying: oven-dried, microwave oven-dried and freeze-dried were considered. The fish samples, previously homogenised, were divided into three batches, and each of them was subjected to the following drying conditions. One batch was oven-dried at 40  $^{\circ}\text{C}$  for 48 h, another batch was microwave oven-dried at 100 W and 300 W for 8 and 18 min hold time respectively, and the third one was frozen with liquid nitrogen (0.029 mbar,  $-48^{\circ}\text{C}$ ) and then lyophilised for 18 h and collected in Teflon vessels. The resulting samples were kept at  $-18^{\circ}\text{C}$  until used either for mercury speciation or total mercury determination.

**Mercury extraction procedures for CV-AFS determination.** (a) *Acid leaching (HCl extraction).* A 300 mg portion of samples and 5 mL of 5 mol  $\text{L}^{-1}$  hydrochloric acid were placed in a centrifuge tube and sonicated for 5 min. After extraction, the suspension was centrifuged at 3500 rpm for 10 min and the supernatant was taken for further analysis. Blanks were prepared in parallel.

(b) *Basic alcoholic extraction: TMAH/MeOH and KOH/MeOH extraction.* About 300 mg of the dry samples were weighed in a centrifuge tube. Three millilitres of a 25% (w/v) tetramethylammonium hydroxide solution in methanol or 3 mL of 25% (w/v) potassium hydroxide solution in methanol were added. The mixture was introduced into a 70  $^{\circ}\text{C}$  water bath for 30 min and sonicated for another 30 min. This procedure was repeated three times, in order to properly digest the sample. After digestion the suspension was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Blanks were prepared in parallel.

(c) *SDS extraction.* About 300 mg of the dry samples were weighed in a centrifuge tube and 3 mL of 5% (w/v) SDS solution were added. The mixture was sonicated for 15 min and then centrifuged at 3500 rpm for 15 min. Blanks were prepared in parallel.

**Mercury extraction procedures for GC-AFS determination.** To 300 mg of sample weighed in 22 mL tubes with PTFE caps, 2 mL of ultrapure water or spike (for recovery studies) were added. The samples were left in contact with the spikes for at least 24 h in the dark before starting the extractions. Mercury was then extracted from the samples following the methods described in the above section, using KOH/MeOH, TMAH/MeOH or HCl. After neutralisation, and once the effervescence and heat had subsided, 3 mL of a solution containing 18% (w/v) KBr and 5% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and 1 mL of 1 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  were added. The mixtures were shaken for a few seconds, left to cool, then centrifuged at 3500 rpm for 10 min to separate any residue left. Extraction of the organomercury species into the organic phase was carried out by adding 5 mL of methylene chloride and shaking for 5 h. The samples were then centrifuged for 10 min.

For organomercury species determination a known volume of solvent layer (4 mL), containing the extracted organomercury, was transferred to a borosilicate glass vial and 1 mL of 0.01 mol  $\text{L}^{-1}$  sodium thiosulfate solution was added, the mixture was shaken for 20 min and subsequently centrifuged at 3500 rpm. The aqueous layer ( $\approx 800 \mu\text{L}$ ) was placed in a 3 mL polyethylene vial and 300  $\mu\text{L}$  of KBr/ $\text{CuSO}_4$  and 300  $\mu\text{L}$  dichloromethane were added. Each vial was manually shaken for 1 min, centrifuged and 0.1–0.2 mL of the organic extract was placed into a 2 mL glass vial containing EtHg as internal

**Table 4** Total mercury concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) found in fish samples under different drying procedures

Sample	Drying procedure	Time	Characteristics	Moisture (%)	Total Hg dry weight/ $\mu\text{g g}^{-1a}$	Total Hg fresh weight/ $\mu\text{g g}^{-1a}$
Tuna	—	—	—	—	—	$0.32 \pm 0.01$
	Oven	48 h	40 °C	60	$0.78 \pm 0.03$	$0.31 \pm 0.01$
	Microwave	18 min	100 W	61	$0.74 \pm 0.03$	$0.29 \pm 0.01$
		8 min	300 W	64	$0.76 \pm 0.04$	$0.27 \pm 0.01$
Freeze-dried	18 h	-48 °C	64	$0.31 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.01$	
Swordfish	—	—	—	—	—	$0.37 \pm 0.01$
	Oven	48 h	40 °C	80	$1.93 \pm 0.06$	$0.38 \pm 0.01$
	Microwave	18 min	100 W	76	$1.40 \pm 0.05$	$0.33 \pm 0.01$
8 min		300 W	81	$0.86 \pm 0.04$	$0.31 \pm 0.01$	
CRM 463 <sup>b</sup>	—	—	—	4	$2.87 \pm 0.07$	—

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  standard deviation at the 95% confidence level (Student's  $t$ )  $n = 5$ . <sup>b</sup>Certified value:  $(2.85 \pm 0.16)$ .

Therefore, in order to achieve a reliable determination of mercury, drying at 40 °C for 48 h is recommended and was chosen for the foregoing investigations.

#### Evaluation of mercury extraction procedures: efficiency and species interconversion

Preliminary experiments were carried out to investigate and optimise mercury extraction within the two main methods of sample treatment described in the literature: alkaline digestion<sup>6,23</sup> and acid leaching.<sup>24</sup> Moreover, due to mercury affinity to sulfide and the fact that SDS has been used for extracting other metals ions, the possibility of its use as a mercury extractant was also evaluated.

Tetramethylammonium hydroxide has been used as a "tissue solubilizer" for various biological samples prior to analysis for major and minor inorganic elements.<sup>25-27</sup> This alkaline digestion with TMAH offers a fast and simple approach to the preparation of a homogenised sample suspension, which is a distinct advantage over conventional slurry preparation methods.<sup>6</sup> On the other hand, HCl has been used by other authors to solubilise MeHg from sediments, water and biological samples.<sup>22,24</sup>

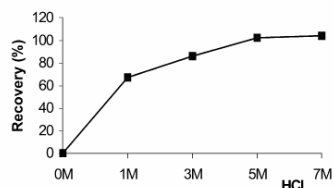
To perform the four extraction procedures (HCl, TMAH, KOH and SDS) ultrasound bath extraction was used as a means of minimising the disadvantages of conventional extraction procedures in terms of time, extraction efficiency and solvent consumption by facilitating and accelerating the process during the pre-treatment of biological samples.

Several variables, such as concentration, volume of extractants reagents and sonication exposure time, were optimised in order to achieve quantitative extraction of mercury species from fish samples. Tuna fish was selected as target sample. The extraction efficiencies reported were calculated by comparing the total mercury found in samples (after microwave digestion) with the extracts by CV-AFS. The mercury extraction efficiencies for the four procedures tested are shown in Table 5. As can be seen, hydrochloric acid (acid leaching) is the only one that provides mercury quantitative recovery. Fig. 2 shows that quantitative extraction was carried out using 5 mL of HCl in concentrations ranging from 5 to 7 mol L<sup>-1</sup>. On the other hand, evaluation of mercury stability in HCl extracts showed

**Table 5** Mercury recovery from tuna fish by applying different extraction media

Extraction media	Recovery (%) <sup>a</sup>
HCl	$97 \pm 5$
KOH/MeOH	$64 \pm 3$
TMAH/MeOH	$67 \pm 3$
SDS	$15 \pm 5$

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  standard deviation at the 95% confidence level (Student's  $t$ )  $n = 5$ .



**Fig. 2** Effect of the hydrochloric acid concentration on mercury extraction efficiency from tuna fish. Sample volume: 5 mL; sonication time: 5 min.

that mercury was stable for at least one week after preparation at room temperature.

The stability study was evaluated by comparing the results obtained *versus* those of freshly prepared extracts ( $t = 0$ ):

$$R = X / X_{(t=0)}$$

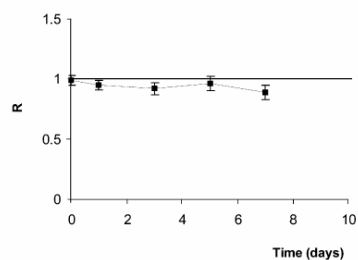
The combined uncertainty ( $U_i$ ) of the measurements is given by the expression:

$$U_i = (CV^2 + CV_{(t=0)}^2)^{1/2} R / 100$$

where  $X$  is the mean value of the measurements made at different times and  $CV$  the coefficient of variation of  $X$ .

In Fig. 3  $R$  is plotted *versus* storage time for total mercury at room temperature. These results clearly indicate that total mercury content remains stable for the storage time of one week, which is of special interest when storage of extracts are required before analysis.

Once total mercury extraction procedures were evaluated and HCl selected as optimum, determination of organic and inorganic mercury was carried out in the acid extract. Inorganic mercury in the 5 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid extract was directly



**Fig. 3** Stability of total mercury on the HCl extract from tuna fish: room temperature.  $R$  defined as ratio between amount of total mercury of stored to fresh HCl extracts.



determined by selective reduction with stannous chloride 3% (m/v) and later measurement by CV-AFS. Total mercury was determined following the same procedure but with a previous  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$  digestion of the extract. Organic mercury was calculated as the difference between the values obtained in the two steps.

The results obtained showed that more than 93–97% of the total Hg occurring in fish samples were organomercury compounds.

Besides its extraction capacity, acid leaching with HCl acid is a very fast procedure for mercury extraction. Therefore, it can provide important advantages for mercury speciation because it allows quantitative mercury extraction in a few minutes, without disturbing their relative original concentration levels.

Methods based on alkaline digestion have occasionally shown overestimation of the methylmercury concentration owing to the risk of unintended methylation of inorganic mercury during sample preparation. Hintelmann *et al.*,<sup>28</sup> reported methylation of  $\text{Hg}^{2+}$  in the range of 1.7%–4.3% for alkaline digestion of fish and liver samples. A similar result ( $5.3 \pm 1.1\%$  methylation of  $\text{Hg}^{2+}$ ) was reported by Quiang *et al.*<sup>17</sup>

In order to evaluate the integrity of the sought species after applying the HCl leaching and the alkaline extractions procedures previously evaluated, mercury speciation of the extracts with GC-AFS was carried out.

Mercury species of the KOH/MeOH, TMAH/MeOH or HCl extracts were converted into their bromide derivatives ( $\text{RHgBr}$ ) by the addition of potassium bromide. Bromide was chosen as the halide source owing to its greater nucleophilic character and the more favourable distribution between the organic and the aqueous phase for  $\text{RHgBr}$  compounds compared to other halides. Furthermore,  $\text{RHgBr}$  compounds are less susceptible to photochemical decomposition than the corresponding iodide derivatives.<sup>15,29</sup>  $\text{CuSO}_4$  was used to improve the release efficiency of organomercury compounds from the sulphydryl group, to which they show a very high affinity. The use of acidic  $\text{KBr/CuSO}_4$  solution avoids formation of emulsions during the subsequent organic solvent extraction step.<sup>30</sup>

Consecutive injections of sample extracts on a megabore column can produce its gradual deterioration because the products of the interaction between polar organomercury compounds and high molecular weight compounds (possibly containing sulfur) could interact with the stationary phase. In order to avoid this problem a thiosulfate-clean-up step was used. Sodium thiosulfate has a high complexing affinity for organic mercury, allowing clean up of the initial dichloromethane extracts of samples.<sup>15</sup> Back-extraction to an aqueous phase and further re-extraction to the organic solvent is recommended to clean up the extracts. Using this procedure the

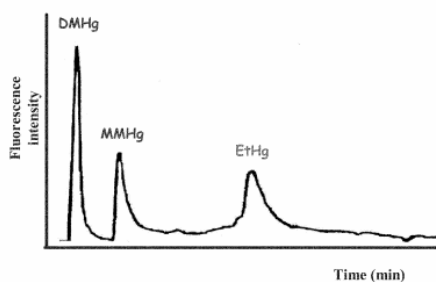


Fig. 4 Typical chromatogram for three methylated mercury species by GC-AFS (20  $\mu\text{g}$  as Hg for each species).

column can be used with no loss of its efficiency avoiding passivation techniques such as mercuric chloride conditioning and the limitations imposed by these processes. In addition, after several routine analyses, a purge-clean column step should be used, injecting 1  $\mu\text{L}$  of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  with a temperature program up to 300  $^\circ\text{C}$  and disconnecting the detector. The glass liner at the injection port should be also periodically cleaned.

Fig. 4 shows a typical chromatogram of the pure mixed mercury standards (DMHg, MMHg and EtHg) obtained by injecting 1  $\mu\text{L}$  of sample and applying the instrumental conditions given previously. Under these conditions species separation was achieved in less than 5.2 min.

Fig. 5 presents the chromatograms for the same sample treated with HCl (Fig. 5A), KOH/MeOH (Fig. 5B) and TMAH/MeOH (Fig. 5C). As it can be seen when the sample is acid leached or alkaline digested (KOH/MeOH) only MMHg is detected. This fact is in good agreement with the literature, where MMHg is the only organomercury compound found in fish.

On the other hand when TMAH/MeOH is used, MMHg and DMHg are detected. Therefore artificial formation of dimethylmercury occurs during sample extraction. Further steps were taken in order to determine if the DMHg is a result of methylation of MMHg because of the TMAH. To do this, the same treatment was employed for the standards of MMHg. Its chromatographic speciation corroborated the fact that a sample containing MMHg digested with TMAH may suffer from about 5% MMHg methylation. This implies that this alkaline extraction provides a source of error in methyl/dimethylmercury determination because of species interconversion.

From these results we conclude that HCl leaching provides the best results for mercury speciation in fish samples. It does

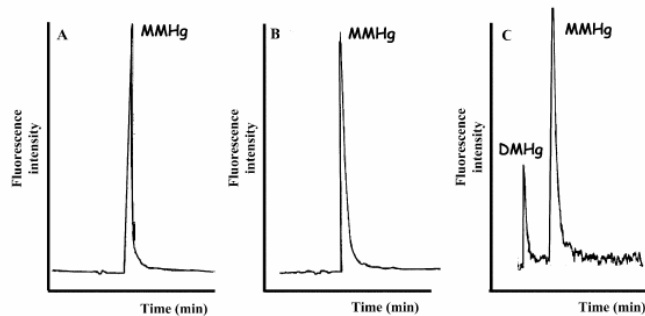


Fig. 5 Chromatograms of a tuna fish sample after extraction with: (A) HCl 5 mol  $\text{L}^{-1}$ ; (B) KOH/MeOH (25% (w/v)); (C) TMAH/MeOH (25% (w/v)). Recorded at different scales.

**Table 6** Methylmercury concentration found in fish samples by HCl leaching-GC-AFS

Sample	Concentration/ $\mu\text{g g}^{-1a}$
Tuna	0.72 $\pm$ 0.05
Swordfish	1.8 $\pm$ 0.1
CRM463 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  standard deviation at the 95% confidence level (Student's *t*) *n* = 3. <sup>b</sup>Certified value: (2.85  $\pm$  0.16).

not only allow mercury quantitative extraction but also overcomes the risk of species transformation. As no DMHg was detected using both HCl and KOH/MeOH procedures we can conclude that this species is not present in the fish samples analysed.

#### Analytical figures of merit

The relative standard deviation of ten replicates at a concentration of 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  as Hg is less than 8% for each mercury species. The linear calibration range extends from 1.2 to 270 pg as Hg for MMHg on the most sensitive setting of the AFS detector.

The proposed HCl leaching GC-AFS method provides a limit of detection for methylmercury of 1.2 pg, calculated as three times the standard deviation of ten blank measurements.

#### Applications

The method was applied to organomercury speciation in fish samples. The results are shown in Table 6. As expected only methylmercury was found in the fish samples. The method was validated by analysing a standard reference material, CRM 463 tuna fish. No significant differences were found between the certified value and the one provided by the acid leaching method (GC-AFS) at 95% confidence level.

Quality control was established by determination of percentage recoveries for each sample using surrogates as described below. A recovery factor (*R*) which varied between 60–80% for methylmercury was used in the calculation to compensate for losses of the analytes during sample preparation. *R* was determined for each sample by analysing the same sample with a known amount of methylmercury and determining the fraction recovered. It is necessary to determine an *R* value for each sample since this is influenced by differences in sample matrices which affect the partitioning of organomercury compounds.

#### Conclusions

It has been demonstrated that lyophilisation and microwave drying processes appear to be risky for speciation because they produce significant losses of mercury. In conclusion, oven dried at 40 °C is the most suitable pre-treatment for fish samples, and if samples are freeze-dried the possible mercury losses should be checked.

Furthermore, a simple and rapid sample preparation procedure including HCl leaching has been optimized for the determination of organomercury compounds. With this fast procedure a quantitative extraction is achieved in 5 min and total and inorganic mercury may be determined by FI-CV-AFS. Therefore, the number of handling steps, the sample preparation and analysis time, as well as potential sources of analytical errors are reduced. After a solvent extraction with

dichloromethane, monomethylmercury, dimethylmercury and ethylmercury can be directly determined by GC-AFS.

Two other extraction methods were evaluated involving alkaline digestion, but lower recoveries were obtained and dimethylmercury formation was observed when using TMAH. This could lead to errors in mercury species determination.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank the CICYT project PB98-0768, Complutense University and Science and Technology Ministry from Madrid, Spain for financial support.

#### References

- 1 H. Y. Zhou and M. H. Wong, *Water Res.*, 2000, **34**(17), 4234–4242.
- 2 D. B. Hugget, J. A. Steevens, J. C. Allgood, C. B. Lutken, C. A. Grace and W. H. Benson, *Chemosphere*, 2001, **42**, 923–929.
- 3 O. Lindqvist, *Water Air, Soil Pollut.*, 1991, **55**, 23–30.
- 4 P. E. Rasmussen, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 2233–2241.
- 5 F. M. Morel, A. M. Kraepiel and M. Amyot, *Atmos. Environ.*, 1998, **32**, 543–566.
- 6 G. Tao, S. N. Willie and R. E. Sturgeon, *Analyst*, 1998, **123**, 1215–1218.
- 7 T. Suzuki, N. Imura and T. Clarkson, *Advances in Mercury Toxicology*, Plenum, New York, 1991.
- 8 A. Boudou and F. Ribeyre, *Met. Ions Biol. Syst.*, 1997, **34**, 289–319.
- 9 C. J. Watras and N. S. Bloom, *Limnol. Oceanogr.*, 1992, **37**, 1313–1318.
- 10 USEPA 1997b, *Guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories: Vol. II, risk assessment and fish consumption limits*, EPA 823-B-97-009.
- 11 C. T. Costley, K. F. Mossop, J. R. Dean, L. M. Garden, J. Marshall and J. Carroll, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **405**, 179–183.
- 12 M. E. Moreno Falcón, PhD Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Spain, 2001.
- 13 K. C. Bowles and S. C. Apte, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **419**, 145–151.
- 14 Y. Cai and J. M. Bayona, *J. Chromatogr., A*, 1995, **696**, 113–122.
- 15 Y. Cai, R. Jaffé, A. Ali and R. D. Jones, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **334**, 251–259.
- 16 S. Díez and J. M. Bayona, *J. Chromatogr., A*, 2002, **963**, 345–351.
- 17 T. Quiang, J. Qian and W. Frech, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 1583–1588.
- 18 R. Falter, H. Hintelmann and P. Quevauviller, *Chemosphere*, 1999, **39**, 1039–1049.
- 19 H. Hintelman, *Chemosphere*, 1999, **39**, 1093–1105.
- 20 H. Emteborg, J. Snell, J. Qian and W. Frech, *Chemosphere*, 1999, **39**, 1137–1152.
- 21 T. M. Grieb, C. T. Briscoll, S. P. Gloss, C. L. Schofield, G. L. Bowie and D. B. Porcello, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, **9**, 919–930.
- 22 J. E. Sánchez Uría and A. Sanz-Medel, *Talanta*, 1998, **47**, 509–524.
- 23 F. Ubillus, A. Alegria, R. Barberá, R. Farré and M. J. Lagarda, *Food Chem.*, 2000, **71**, 529–533.
- 24 S. Río-Segade and C. Bendicho, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 263–268.
- 25 Y. Zhou, M. K. Wong, L. L. Koh and Y. C. Wee, *Talanta*, 1996, **41**, 1061–1067.
- 26 Y. X. Tan, W. D. Marshall and J. S. Blais, *Analyst*, 1996, **121**, 483–489.
- 27 Y. X. Tan, W. D. Marshall and J. S. Blais, *Analyst*, 1997, **122**, 13–20.
- 28 H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilger and R. D. Evans, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1997, **358**, 363.
- 29 Y. Cai, R. Jaffé and R. Jones, *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31**, 302–305.
- 30 A. Ali, R. Jaffé and R. Jones, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1994, **17**, 745–748.

## **2. EXTRACCIÓN DE SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE EL USO DE LA SONDA DE ULTRASONIDOS Y POSTERIOR DETECCIÓN CON ICP-MS Y HPLC-ICP-MS.**

A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara.

“Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis”

***Anal. Bioanal. Chem.***, 2005, 381, 373-379.

Estudios preliminares se presentaron en forma de póster en la “XIX Reunión Nacional de Espectroscopia”, Gran Canaria, 4-9 de Julio 2004.

El trabajo completo se presentó como comunicación oral invitada en “European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry”. Budapest, Hungría. 1-4 Febrero 2005.

Ana I. Cabañero · Yolanda Madrid · Carmen Cámara

## Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis

Received: 18 May 2004 / Revised: 29 July 2004 / Accepted: 30 July 2004 / Published online: 15 September 2004  
© Springer-Verlag 2004

**Abstract** This paper describes a fast, simple and novel extraction method for total selenium and selenium species determination in food samples. Parameters influencing extraction, such as sonication time, extracting media, temperature, sample mass, ultrasound amplitude and sample/enzyme mass ratio were investigated. The enzymatic hydrolysis proposed, enhanced by probe sonication, allowed the quantitative extraction of selenium in chicken muscle, liver, kidney and feed (97, 93, 95 and 102%, respectively) in 2 min, maintaining the original Se-species integrity. Total Se content of the samples was determined using inductively coupled plasma mass spectrometry. Se-species were identified and quantified using high-performance liquid chromatography in conjunction with inductively coupled plasma mass spectrometry. Chromatographic analyses were carried out under two chromatographic conditions and led to the identification of SeMet in all samples. The accuracy of the proposed method was assessed using certified reference materials as well as microwave digestion. Potential advantages of the proposed method over traditional hydrolysis are speed, simplicity and safety of the procedure.

**Keywords** Selenium · Extraction · Speciation · Selenomethionine · Food

### Introduction

Solid sample pre-treatment has been the Achilles' heel of the analytical process, mainly due to time consumption, almost from the era of alchemy to the present time [1, 2,

3, 4, 5]. Therefore, considerable interest has been expressed in shortened and simplified sample preparation procedures for trace element analysis [5, 6].

In this respect, sonochemistry (chemistry enhanced by ultrasound) has emerged as an interesting alternative to traditional sample pre-treatment methods (hot plate and microwave digestion) for total metal and species determination in different matrices.

Ultrasonic energy has been used infrequently in analytical chemistry, although it is a powerful tool for accelerating various steps, such as dissolution, fusion and leaching in the analytical process [7]. Ultrasound could facilitate the analytical determination of analytes since it diminishes matrix effects as a result of the separation of the analyte from non-extractable and potentially interfering matrix concomitants [8].

Therefore, ultrasound-assisted leaching is a fast, inexpensive and efficient alternative to conventional extraction techniques, as demonstrated by its application to both organic and inorganic analytes in a wide variety of samples [7], and is currently emerging as an alternative to developing more rapid methods [9, 10].

Selenium is an essential micronutrient for humans and is also a constituent of enzymes (such as glutathione peroxidase and 1-iodothyronine 5-deiodinase). In addition, it is recognised that Se provides protection against various forms of cancer [11, 12]. However, Se is also considered to be a toxic element at high concentrations.

For most people, the most important sources of Se in the diet are cereals, meat and fish. In fact, meat and fish appear to make rather stable contributions of Se, generally around 40–50% of the total Se ingested, regardless of the level of total Se consumed [13]. Therefore, the interest in total selenium content and species determination in chicken samples is of special concern because of its high consumption and the selenium accumulation capacity in animals.

It is recognised that the toxic or beneficial effects from selenium are not governed by their total concentration, instead it comes from the Se species that can interact efficiently with sites on biological ligands. For

A. I. Cabañero · Y. Madrid (✉) · C. Cámara  
Departamento de Química Analítica,  
Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Complutense de Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid,  
Spain  
E-mail: ymadrid@quim.ucm.es

instance, selenium may substitute sulphur in sulphur-amino acids to form the Se analogues selenocystine (SeCys<sub>2</sub>) and selenomethionine (SeMet), which are the main forms of Se found in food [14].

The identification and quantification of elemental species provides information about bioaccumulation, detoxification and toxicological implications [15]. Therefore, the interest in selenium speciation in food and biological samples is currently increasing. Consequently, food safety and nutritional quality depend not only on the determination of total levels but also on the speciation of the trace elements that exist in foodstuffs.

For selenium speciation, different approaches such as enzymatic, acid and basic hydrolysis have been proposed, the former being the most widely used. The application of pronase [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22], proteinase-K [23, 24], subtilisin [19, 20], pepsin [16, 22, 25], and trypsin [16, 22] for Se speciation has been reported in technical papers. These methods offer certain advantages in terms of the moderate conditions of temperature and pH, preventing elemental losses by volatilisation. However, their main advantage is their selectivity because enzymes act only on certain chemical bonds and it is possible to distinguish among fractions of elements bonded to different components of the sample matrix. On the other hand, these processes sometimes require two consecutive steps, each of them lasting up to 24 h at 37 °C. This methodology is extremely time-consuming, and therefore the risk of selenium species interconversion could be high.

The use of enzymes in conjunction with ultrasonic energy has already been reported, and it seems that ultrasonication enhances the activity of the enzyme. Although it has been used satisfactorily for selenium determination and speciation in yeast (Capelo et al [19]), it has never been used in studies of Se speciation in food samples.

The aim of this work was to develop and to optimise a focused ultrasound-assisted enzymatic extraction method which allows the quantitative, simple and rapid extraction of Se in food samples, maintaining the original Se species integrity. The optimisation of parameters affecting the process, such as extraction media, sample/enzyme ratio, and sonication time, is described. Microwave-assisted digestion and enzymatic hydrolysis were used as comparative methods.

## Experimental

### Apparatus

A Sonoplus ultrasonic homogeniser (Bandelin, Germany) fitted with a HF generator 2200 was used for selenium extraction. The homogeniser was equipped with a titanium micro-tip of 3 mm diameter and the power was set to 20 W. The frequency was fixed at 20 kHz.

An inductively-coupled plasma mass spectrometer, (ICP-MS, HP-4500 Plus, Tokyo, Japan), fitted with a

Babington nebuliser and a Scott double-pass spray chamber cooled by a Peltier system was used for total selenium determination and selenium detection after chromatographic separation.

A PU-2089 HPLC pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a six-port sample injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a 100 µl injection loop was used for the chromatographic experiments. Separations were carried out in a Hamilton PRP-X200 (10 µm, 250×4.1 mm i.d.) (Reno, NV, USA) cationic column. Se species quantification was performed in the peak area mode. Data evaluation was carried out with HP ChemStation software.

For molecular weight fractionation, 10 kDa cut-off filters (Millipore, Bedford, MA, USA) and an Eppendorf (Hamburg, Germany) Centrifuge 5804, F34-6-38 were used.

### Reagents and samples

All reagents were of analytical grade and were used without further purification. Selenocystine and selenomethionine (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 3% hydrochloric acid and deionised Milli-Q water, respectively. Trimethylselenonium chloride was synthesised in our laboratory. Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenite and sodium selenate (Merck, Darmstadt, Germany) in deionised Milli-Q water (Millipore). Stock solutions of 10 mg l<sup>-1</sup> were stored in the dark at 4 °C. Working standard solutions were prepared daily by dilution.

For HPLC-ICP-MS studies, the mobile phase was 4 mmol l<sup>-1</sup> pyridine formate in 3% methanol. The eluent was prepared by diluting commercial pyridine (Merck) with distilled water and adjusting the pH to 2.8 or 4.7 with formic acid (Merck). HPLC-grade methanol was purchased from SDS (Barcelona, Spain). For the enzymatic extraction procedure, TRIS-HCl buffer (pH=7.5) and the non-specific protease XIV (*Streptomyces griseus*) (Merck), were used to prepare the chicken samples.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) were used for acid digestion of samples.

Food samples (chicken muscle, kidney and liver) were homogenised and dried at 40 °C for 48 h. The resulting samples were ground, homogenised and kept at -18 °C until use.

### Procedures

#### *Total selenium: microwave digestion*

Chicken muscle (0.2 g of dried sample), chicken liver (0.1 g) and chicken kidney (0.050 g) were digested with 2 ml of nitric acid and 0.5 ml of hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 43% power output. The

pressure was held at 20 psi for 15 min, at 40 psi for 30 min and finally at 85 psi for 1 h.

#### Total selenium: probe sonication extraction

Chicken muscle (0.150 g of dried sample), chicken liver (0.1 g) and chicken kidney (0.050 g) were placed in a 10 ml Teflon vial. Then 20% of the sample weight of the non-specific protease *S. griseus* (protease XIV) was added to 3 ml of the extraction media. The mixture was sonicated for 120 s at 20 W power intensity. The resulting suspension was centrifuged at 4,000 rpm for 20 min and aliquots of supernatant were taken for total selenium determination.

#### Total selenium determination

The total selenium content of the sample from microwave or sonication treatment was measured by ICP-MS. For this purpose, the isotopes  $^{78}\text{Se}$  and  $^{82}\text{Se}$  were monitored. The negligible differences between Se concentrations using both isotopes for Se quantification confirmed the absence of interference.  $^{103}\text{Rh}$  was used as an internal standard. Total selenium concentration was determined by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by ICP-MS.

#### Selenium species leaching: traditional enzymatic hydrolysis

The extraction of selenium species was performed following the enzymatic procedure used by Moreno et al [20], using the non-specific protease (*S. griseus*, Pronase-E) instead of Subtilisin (incubation at 37 °C for 48 h at pH 7.5).

#### Selenium species leaching: enzymatic probe sonication extraction

Selenium species extraction was carried out following the same conditions as for total selenium determination. Chicken muscle (0.150 g of dried sample), chicken liver (0.1 g) and chicken kidney (0.050 g) were placed in a 10 ml Teflon vial. Then 20% of the sample weight of the non-specific protease *S. griseus* (protease XIV) was added to 3 ml of the extraction media. The mixture was sonicated for 120 s at 20 W of power intensity. The resulting suspension was centrifuged at 4,000 rpm for 20 min.

#### Selenium species determination

In order to enhance the clean-up of the sample after enzymatic hydrolysis, the samples were centrifuged and the supernatants were removed and passed through a 10 kDa cut-off filter (centrifugation at 7,500 g and 20 °C). Finally, the filtrates were diluted to 10 ml with Milli-Q-water.

For selenium speciation, subsequent measurement of the extract was carried out by LC-ICP-MS using the operating conditions given in Table 1.

## Results and discussion

The total Se contents of the chicken samples were determined in order to evaluate the efficiencies of the different sonication procedures tested for total Se and Se species extraction. Samples were microwave-digested and the determination of selenium was performed by FI-ICP-MS. The results obtained are shown in Table 2. The mean selenium concentration in chicken ranged from 0.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  in muscle to 3.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  in kidney.

#### Probe sonication extraction conditions for total selenium

Acid mineralisation is currently the most popular sample pre-treatment for element determination in biological materials, but noting that Se is mostly bonded to proteins in food, we evaluated an enzymatic leaching method.

In order to assess the extraction capability of the enzymatic probe sonication, the following variables were optimised: (1) sonication time and extracting media; (2) temperature; (3) sample/enzyme mass ratio, and; (4) ultrasound amplitude and sample mass.

**Table 1** Instrumental operating conditions for Se determination by HPLC-ICP-MS

HPLC parameters	
Analytical column	PRPX-200
Eluent	4 mM pyridine formate solution, H <sub>2</sub> O:MeOH (97:3)
Eluent flow rate	1 ml min <sup>-1</sup>
Elution programme	Isocratic
Injection volume	100 $\mu\text{l}$
<b>ICP-MS conditions</b>	
Forward power	1,350 W
Plasma gas (Ar) flow rate	15 l min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas (Ar) flow rate	1.3 l min <sup>-1</sup>
Carrier gas (Ar) flow rate	1.1 l min <sup>-1</sup>
Nebuliser type	Babington

**Table 2** Total selenium concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) found in chicken samples by FI-ICP-MS after microwave digestion

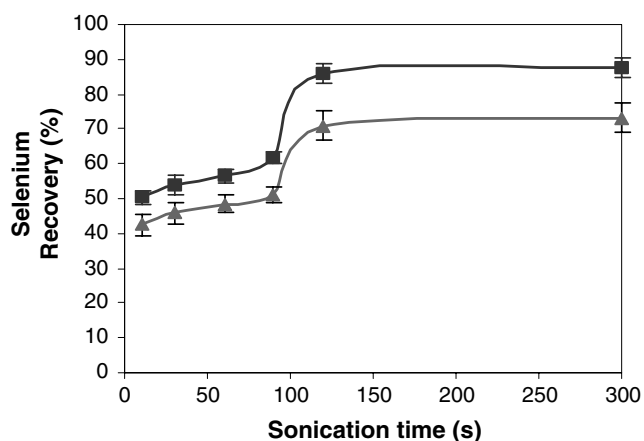
Sample	Moisture (%)	Total Se ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Chicken muscle	73	0.88 ± 0.02
Chicken liver	72	2.34 ± 0.07
Chicken kidney	75	3.31 ± 0.09
Chicken feed	–	0.75 ± 0.04

Results based on dried sample;  $n=4$

Sonication time (10 s to 5 min) and extracting media (water and Tris-HCl buffer pH 7.5) (Fig. 1) have a significant influence on the extraction efficiency. As was expected, the extraction efficiency increased with increasing sonication time. Both extracting media reached and maintained maximum recovery at sonication times of over 2 min. Therefore, an extremely short sonication time (2 min) was suitable for selenium extraction, which is an advantage of this technique compared to other routine extraction methods.

The use of Tris-HCl buffer results in better recoveries than water (28% higher recovery), so the use of a buffered solution was proposed. This result was expected as enzymes work as a catalysts careful control of the pH is required when the enzymatic process is in progress, otherwise the enzyme activity may be reduced or inhibited [19].

Since careful temperature control is required to optimise the activity of the enzymes, and hot spots are produced as a consequence of acoustic cavitation when ultrasound is applied in a liquid, a study of the influence of temperature on the recovery of Se was carried out. Selenium recovery did not improve when the temperature was decreased, which could be due to the fact that



**Fig. 1** Effect of sonication time on Se extraction. Conditions: 150 mg of sample, 15 mg of enzyme protease XIV, and 10% ultrasound amplitude. *Triangles* 3 ml of water, *squares* 3 ml Tris-HCl buffer (pH 7.5)

the size of the bubbles generated is very small compared to the total liquid volume, so the heat that they produce is rapidly dissipated with no appreciable change in environmental conditions [7]. For this reason, temperature control is not required. Consequently, room temperature (25 °C) was chosen as the working temperature.

Different amounts of protease were tested in order to evaluate its effect on the extraction efficiency. As can be seen in Table 3, a sample/enzyme mass ratio of 5 provided quantitative recovery in the Tris-HCl buffer, so this was the ratio chosen for further selenium extractions. Moreover, total Se extraction is only achieved when focused ultrasound is applied in the presence of enzymes. Evidently, a high fraction of the total Se in chicken is bound to protein (selenoproteins or Se-containing proteins).

Furthermore, the extremely short time period required for a quantitative extraction may suggest a spectacular finding, because traditional enzymatic procedures usually require a long treatment period. Hence, it can be stated that sonochemistry enhances the activity of the enzyme, maybe because the efficiency of mixing and diffusing the reaction components is increased, or because ultrasound may also affect intermolecular interactions involving substrates. In addition, the wall cell disruption capability of the ultrasonic probe aids the contact between the enzyme and intracellular components that normally do not come into contact with the enzyme.

The variation of sample mass, 25–200 mg, did not entail any modifications in the recovery of the studied analyte. Furthermore, the variation of ultrasound amplitude by 10–30% did not affect the extraction efficiency.

#### Analytical figures of merit and application

The equation for the linear range of the Se calibration graph was the following:

$Y = 30304 X + 80357$  where  $Y$  is the number of counts and  $X$  is the Se concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). The regression coefficient was 0.999.

**Table 3** Effect of sample/enzyme mass ratio on selenium extraction from chicken samples

Sample	Extracting media	Sample/enzyme mass ratio	Total Se recovery (%)
Chicken muscle	Water	10	67 ± 4
	Water	5	85 ± 6
	Tris-HCl buffer	Without enzyme	42 ± 3
	Tris-HCl buffer	10	86 ± 4
	Tris-HCl buffer	5	97 ± 3
Chicken liver	Water	10	43 ± 3
	Water	5	56 ± 3
	Tris-HCl buffer	10	84 ± 8
	Tris-HCl buffer	5	93 ± 6
	Tris-HCl buffer	10	93 ± 6
Chicken kidney	Water	10	30 ± 2
	Water	5	35 ± 2
	Tris-HCl buffer	10	81 ± 4
	Tris-HCl buffer	5	95 ± 4
	Tris-HCl buffer	10	95 ± 4

The detection and quantification limits, given by  $LOD = 3(SD/m)$ , and  $LOQ = 10(SD/m)$ , respectively, where  $SD$  is the standard deviation of 11 measurements of a reagent blank and  $m$  the slope of the calibration of standard addition graph, were calculated. The  $LOD$  and  $LOQ$  for Se in the real samples analysed were 2.4 and 8.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. Both values were calculated taking into account that the Se was extracted from 150 mg of solid material and that it was in a 3 ml volume of Tris-HCl buffer.

Once it was decided that the optimised enzymatic probe sonication extraction was able to quantitatively extract selenium, it was applied to chicken muscle, liver, kidney and feed. The extraction conditions used in all cases were: 10% ultrasound amplitude; 2 min sonication time; Tris-HCl buffer (3 ml volume). The results presented in Table 4 show that the developed method is able to release the selenium content quantitatively in a variety of food samples in an extremely short period of time, drastically reducing the time involved in sample pre-treatment when compared with traditional methods.

The proposed method was validated by analysing a standard reference material, CRM 278 (mussel tissue). At the 95% confidence level no significant differences were detected between the certified value and the experimental one, so the method used was considered accurate for total selenium determination.

#### Evaluation of enzymatic probe sonication: efficiency and selenium species stability

As stated previously, a focused ultrasound extraction method was optimised in order to carry out studies on Se speciation in food samples. The optimisation of those parameters affecting the process such as extracting media (water or Tris-HCl buffer), sample/enzyme ratio and sonication time were evaluated, as was done for total Se extraction. The best recoveries were found when working under optimised conditions for total Se extraction (20% enzyme and Tris-HCl buffer).

The selenium recoveries, after ultrafiltration with 10 kDa cut-off filters, for chicken kidney, liver, muscle and feed, were: 50, 62, 70 and 93%, respectively, which means that some selenium may remain in peptide form. This explanation stems from the knowledge that, during the enzymatic hydrolysis of proteins, some peptide

**Table 4** Analytical results for Se after the proposed enzymatic probe sonication extraction

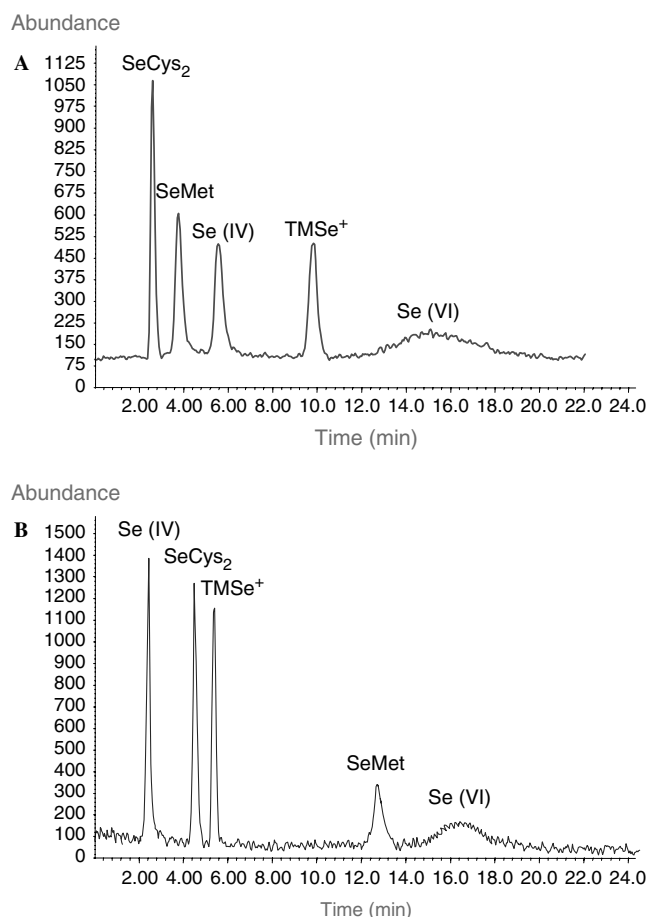
Sample	Total Se ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Recovery (%)
Chicken muscle	$0.85 \pm 0.04$	$97 \pm 4$
Chicken liver	$2.2 \pm 0.1$	$93 \pm 4$
Chicken kidney	$3.1 \pm 0.2$	$95 \pm 6$
Chicken feed	$0.74 \pm 0.04$	$102 \pm 5$
CRM 278 <sub>II</sub>	$1.6 \pm 0.1$	$98 \pm 6$

Results based on dried sample;  $n = 4$   
<sup>a</sup>certified value:  $(1.66 \pm 0.04)$

bonds can remain intact, depending on the cleavage specificity of the enzyme [26]. This could be the reason why a selenium fraction with a molecular weight higher than 10 kDa remained after the enzymatic hydrolysis step.

To ensure that no selenium compounds lower than 10 kDa were retained in the filters, we determined the total selenium content in the extracts (spiked with the standards) after filtration. The results, with an average recovery of  $97 \pm 3\%$  of total selenium, showed that significant selenium losses did not occur with this sample treatment.

In this study, five standard Se compounds and two mobile phases were tested for Se separation using a cationic exchange column. If a species is identified under two different chromatographic conditions, its identity can be stated with more certainty. Because of this, different experiments were carried out to provide good resolution for standard solutions using a mobile phase at two pH values (2.8 and 4.7). Standard chromatograms for both pHs are shown in Fig. 2. Under optimal chromatographic conditions, it is possible to identify these species within 20 min.



**Fig. 2a,b** Chromatograms of  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  of Se species obtained using cationic exchange chromatography at two pH values: **a** 4.7 and **b** 2.8



Chromatographic analyses were performed on four different food samples. Figure 3 shows the chromatograms obtained for these samples. Two peaks can be distinguished in each of the evaluated samples. The first peak was unidentified; it could not be attributed to any of the selenium species tested, so it could correspond to an anionic selenium species that eluted in the dead volume. The second peak was identified as SeMet, the only seleno-amino acid found in all samples. Peak identification was carried out by the spiking procedure. The same chromatographic profiles were obtained at both pHs.

The results from the speciation analyses of the food samples are shown in Table 5. The amount of SeMet varied depending on the type of sample.

Chicken muscle, liver and kidney contain differing amounts of SeMet (51, 13 and 8%, respectively). In animals, SeMet is incorporated into tissue proteins in place of Met, especially in the skeletal muscles, the liver and the testes (SeMet), making the skeletal muscle the largest body pool of Se [14, 27, 28]. This fact may explain why the SeMet concentration found in muscle was higher than in liver or kidney. Furthermore, the feed used for the target chicken was also analysed for Se

**Table 5** Results from the speciation analyses of chicken samples

Sample	Total SeMet ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Chicken muscle	$0.45 \pm 0.03$
Chicken liver	$0.30 \pm 0.02$
Chicken kidney	$0.26 \pm 0.02$
Chicken feed	$0.68 \pm 0.03$

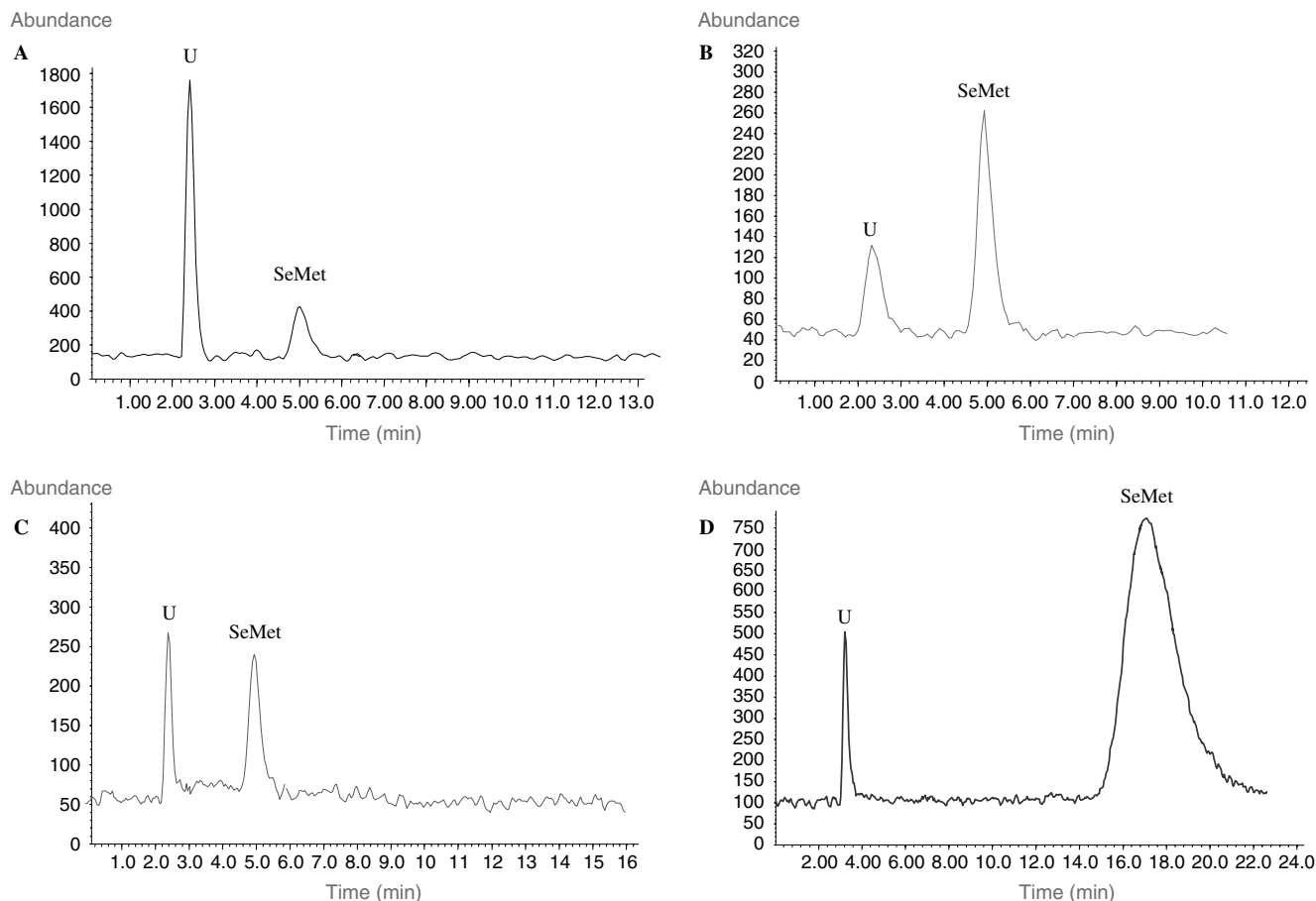
$n = 4$

species. In this type of sample, 90% of the total Se has been found to be SeMet. According to the literature, Se-accumulators such as cereals and forage crops convert Se predominantly into SeMet [28]. Taking into account that the main components of the feed were: corn, wheat and soybeans, the value found is comparable with other SeMet data found in this type of cereal [28].

#### Selenium species stability

The use of appropriate methods of protein hydrolysis is of key importance irrespective of the method of Se species determination used. Conditions must be carefully chosen to achieve complete protein hydrolysis with minimal concomitant destruction of the Se species. Furthermore, when studying Se speciation, one should not rule out the possibility that the extraction method employed may cause transformation of the Se species

**Fig. 3a–d** Chromatograms of Se species found after probe sonication extraction of: **a** chicken kidney, **b** muscle **c** liver at pH 4.7 and **d** feed at pH 2.8. U = unidentified Se species



and that the Se species content in the extracts may change.

To improve selenium species recovery, longer extraction times (up to 360 s) were applied and speciation analyses were performed. The results shows that no further improvement was achieved by increasing the sonication time, and the SeMet peak did not change. Moreover, no additional species appeared when different sonication times were used in both the samples and the SeMet standard solution. These facts support a lack of interconversion between selenium species.

In addition to that, an evaluation of SeMet stability in enzymatic extracts was carried out. Results showed that this species was stable for at least 48 h after sonication at room temperature. Therefore, our results may be comparable to other enzymatic hydrolysis that require longer times (24–48 h).

Finally, due to the lack of CRMs (one of the main problems concerning speciation), the results obtained were compared with the results from an alternative previously developed enzymatic procedure [20].

In order to carry out this comparison, the samples were hydrolysed independently following both methods, and subjected to the same chromatographic conditions.

The results showed that the same chromatographic profiles, and no additional species, appeared. Furthermore, the same percentage of SeMet was obtained in chicken feed, muscle, liver and kidney (90, 50, 14 and 7%, respectively). Therefore, it can be stated that the duration required for enzymatic incubation has been substantially shortened (by three orders of magnitude) using the ultrasonic probe, and yet this technique still provides results in agreement with those obtained using a validated enzymatic hydrolysis technique.

## Conclusions

An accurate and sensitive method based on the use of enzymatic probe sonication extraction has been found to be a fast and simple extraction method for total selenium and selenium species determination in food samples.

Ultrasound energy allowed us to quantitatively extract the Se content in a variety of food samples, maintaining the original Se species integrity, as in the conventional enzymatic procedure. In addition, it allowed us to improve (in kinetic terms) the selenium extraction, substantially reducing the time required for enzymatic hydrolysis from days (required for the traditional method) to only a couple of minutes (for our ultrasound-based method).

Therefore, the use of enzymatic hydrolysis in conjunction with focused ultrasound was found to be an efficient method for catalysing the breakdown of Se-containing proteins into selenoamino acids. Furthermore, it provided several benefits over other traditional methods of preparing samples for subsequent selenium determination: shortened sample preparation times,

reduced consumption of reagents, simplicity, and enhanced safety.

As a result, the technique described here is expected to be widely used for analytical purposes in the future, owing to the simplicity, speed, safety and performance attributes of this sample preparation technique.

**Acknowledgements** The authors wish to thank to Ana Serrano for her contribution to this work. One of the authors (A. Cabañero) wishes to thank Complutense University for their support through a predoctoral fellowship.

## References

- Luque de Castro MD, Jiménez-Carmona MM (1998) *TrAC-Trend Anal Chem* 17:441–447
- Nascentes CC, Kornb M, Arrudaa MAZ (2001) *Microchem J* 69:37–43
- Brunori C, Ipolyi I, Macaluso L, Morabito R (2004) *Anal Chim Acta* 510:101–107
- Lima EC, Barbosa F, Krug FJ, Silva MM, Vale MGR (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:995–1000
- Luque de Castro MD, da Silva MP (1997) *TrAC-Trend Anal Chem* 16:16–24
- Ashley K, Andrews RN, Cavazos L, Demange MJ (2001) *J Anal Atom Spectrom* 16:1147–1151
- Luque-García JL, Luque de Castro MD (2003) *TrAC-Trend Anal Chem* 22:41–47
- Santos C, Alava-Moreno F, Lavilla I, Bendicho C (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:987–992
- Pérez-Cid B, Lavilla I, Bendicho C (1998) *Anal Chim Acta* 360:35–39
- López-González A, Probanza A, Galli V, Hevia C, Marin A, Muñoz-Campos F, Barbas C (1999) *Chem Ecol* 16:297–301
- Combs CF, Gray WP (1998) *Pharmacol Ther* 79:179–192
- Pyrzynska K (2001) *Talanta* 55:657–667
- Combs GF, Combs SB (eds) (1986) *The role of selenium in nutrition*. Academic, New York
- Daniels LA (1996) *Biol Trace Elem Res* 54:185–199
- McSheehy S, Mester Z (2003) *TrAC-Trend Anal Chem* 22:311–326
- Dernovics M, Stefánka Z, Fodor P (2002) *Anal Bioanal Chem* 372:473–480
- Gilon N, Potin-Gautier M, Astruc M (1996) *J Chromatogr A* 750:327–334
- Gilon N, Astruc A, Astruc M, Gautier M (1995) *Appl Organomet Chem* 9:623–628
- Capelo JL, Ximénez-Embún P, Madrid-Albarrán Y, Cámara C (2004) *Anal Chem* 76:233–237
- Moreno P, Quijano MA, Gutiérrez AM, Pérez-Conde MC, Cámara C (2001) *J Anal Atom Spectrom* 16:1044–1050
- Larsen EH, Sloth J, Hansen M, Moesgaard S (2003) *J Anal Atom Spectrom* 18:310–316
- Stefánka Z, Ipolyi I, Dernovics M, Fodor P (2001) *Talanta* 55:437–447
- B'Hymer C, Caruso JA (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:1531–1539
- Vonderheide AP, Wrobel K, Kannamkumarath SS, B'Hymer C, Montes-Bayón M, Ponce de León C, Caruso JA (2002) *J Agr Food Chem* 50:5722–5728
- Ponce de Leon CA, Sutton KL, Caruso JA, Uden PC (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:1103–1107
- Abou-Shakra FR, Rayman MP, Ward NI, Hotton V, Bastina G (1997) *J Anal Atom Spectrom* 12:429–433
- Schrauzer GN (2000) *J Nutr* 130:1653–1656
- Schrauzer GN (2003) *Adv Food Nutr Res* 47:73–112

**DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO TOTAL Y  
SUS ESPECIES EN PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO**

Capítulo VI

## **CAPITULO VI: DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES EN PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO**

---

**1. CUANTIFICACIÓN Y ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO EN ESPECIES DE PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO EN ESPAÑA Y PORTUGAL.**

**2. DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES BIOACCESIBLES EN MUESTRAS DE PESCADO MEDIANTE UN MÉTODO DE DIGESTIÓN "IN VITRO".**

---

La principal fuente de mercurio en la alimentación humana son los pescados, especialmente en países como España y Portugal donde su consumo es muy elevado.

A pesar de las ventajas nutricionales que este alimento aporta, existe cierta precaución en su consumo por su conocida bioacumulación de mercurio. Por otra parte, existen evidencias de que el selenio presente en los pescados, aparte de ser un micronutriente esencial, podría contrarrestar la toxicidad derivada del mercurio.

Por ello, el objetivo de este capítulo es evaluar el riesgo asociado a la exposición del hombre al mercurio a través del consumo de pescado. Este estudio implica la determinación de los contenidos totales de mercurio y selenio y sus formas químicas presentes en los pescados seleccionados. Las metodologías empleadas y los resultados obtenidos se recogen en las dos publicaciones que a continuación se reseñan.

En la primera publicación (sección 1) **“Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal”** (*Biol. Trace Elem. Research*, 2005, 103, 17-35) se aplicó la metodología analítica indicada en el capítulo anterior y se evaluó la concentración del mercurio y selenio total y sus especies en pescados comúnmente consumidos en España y Portugal (Sardina, atún, etc.).

Los contenidos totales de ambos elementos se determinaron mediante los acoplamientos CV-AFS y HG-AFS, previa digestión de las muestras con horno microondas. Los valores obtenidos se compararon con los valores admitidos por la legislación europea vigente.

La especiación de mercurio en las muestras se llevó a cabo mediante el acoplamiento GC-pyro-AFS, previa extracción de la muestra en medio ácido.

La extracción de las especies de selenio se llevó a cabo por un sistema secuencial de extracción en medio acuoso, combinado con procesos de hidrólisis enzimática de las distintas fracciones obtenidas, con el fin de facilitar la extracción de sus especies y esclarecer la distribución de selenio en las muestras. La identificación y cuantificación de las especies de selenio se logró mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

Una vez obtenidos los datos por los procedimientos mencionados se establecieron las relaciones molares Se:Hg y SeMet:MeHg en cada una de las especies con el fin de seleccionar a aquella especie de mayor interés desde el punto de vista toxicológico.

En la segunda publicación (sección 2) **“Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method”** (*Anal. Chim. Acta*, 2004, 526, 51-61) se presenta la aplicación de un procedimiento de digestión “*in vitro*” para la determinación del contenido de mercurio y selenio total y sus especies bioaccesibles en pescados. Los estudios se llevaron a cabo sobre muestras de atún, pez espada y sardina y atún cocinado, para evaluar la disponibilidad del Hg y Se en estas especies distintas especies de pescado de elevado consumo y el efecto que el proceso de cocinado ejerce sobre dicha bioaccesibilidad.

Los contenidos bioaccesibles totales de ambos elementos se determinaron mediante los acoplamientos CV-AFS y HG-AFS.

Los estudios de especiación de selenio sobre los extractos gástrico y gastrointestinal se realizaron mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

La integridad de las especies de mercurio en ambos extractos se logró mediante el acoplamiento CV-AFS, empleando una reducción selectiva.

Con el fin de valorar las especies de mayor interés toxicológico se determinaron las correlaciones entre las concentraciones molares de selenio y mercurio bioaccesibles.

## **1. CUANTIFICACIÓN Y ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO EN ESPECIES DE PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO EN ESPAÑA Y PORTUGAL.**

A.I. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoréu, C. Cámara.

“Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal”

***Biol. Trace Elem. Research***, 2005, 103, 17-35.

Estudios preliminares se presentaron en forma de póster en “8<sup>th</sup> Meeting of the International Neurotoxicology Association”, Lisboa, Portugal. 25-26 de Octubre 2001.

El trabajo completo se presentó como poster en “5<sup>th</sup> International Symposium on Speciation of Elements in Biological, Environmental and Toxicological Sciences”, Almuñecar. 12-15 de Septiembre 2003.

# Quantification and Speciation of Mercury and Selenium in Fish Samples of High Consumption in Spain and Portugal

ANA I. CABAÑERO,<sup>1</sup> CRISTINA CARVALHO,<sup>2</sup>  
YOLANDA MADRID,<sup>1</sup> CAMILA BATORÉU,<sup>2</sup>  
AND CARMEN CÁMARA<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias  
Químicas, Universidad Complutense de Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain  
(E-mail: ccamara@quim.ucm.es);* <sup>2</sup>*Centro de Ciências  
Farmaceuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa,  
Av. Prof. Gama Pinto 1649-003 Lisboa, Portugal.*

Received February 13, 2004; Revised April 27, 2004;  
Accepted May 31, 2004.

## ABSTRACT

Mercury (Hg) and selenium (Se) determinations were carried out to evaluate human exposure to those elements through fish consumption in Spain and Portugal. Atomic fluorescence spectroscopy (AFS) was applied in a cold vapor mode for total mercury quantification and was also hyphenated to gas chromatography (GC) to achieve the speciation of organomercurial species in fish samples. The results obtained show the highest concentration of Hg in swordfish and tuna ( $0.47 \pm 0.02$  and  $0.31 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively), and a much lower concentration in sardine, mackerel shad, and octopus ( $0.048 \pm 0.002$ ,  $0.033 \pm 0.001$ , and  $0.024 \pm 0.001 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively). The determination of alkyl mercury compounds revealed that 93–98% of mercury in the fish the three fish species with higher mercury content.

Total selenium concentration was high in sardine, swordfish, and tuna ( $0.43 \pm 0.02$ ,  $0.47 \pm 0.02$ , and  $0.92 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively), but low in mackerel shad and octopus ( $0.26 \pm 0.01$  and  $0.13 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively). Speciation of selenium compounds was done by high-performance liquid

\* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

chromatography in conjunction with inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). Selenomethionine (SeMet) was the only selenium compound identified in the fish samples with higher selenium content.

Among the fish species studied, sardine had the most favourable Se:Hg and SeMet:MeHg molar ratios; therefore, its consumption seems to be preferable.

**Index Entries:** Mercury, selenium, selenomethionine, speciation, fish.

## INTRODUCTION

Mercury pollution has become a global problem because of its occurrence from natural and anthropogenic sources (1), and its detrimental effect on humans, making its detection of special concern among environmental pollutants.

Mercury toxicity is well known to be highly dependent on its chemical form (2). Methylmercury is the most important Hg species in terms of bioaccumulation and risk owing to its long biological half-life and accumulation through the food chain.

The major source of MeHg for humans is fish, because predatory species may preconcentrate 10,000–100,000 times the mercury concentration in water (3). Factors accounting for this magnification can be fish size and/or fat content (4,5), the protein affinity mechanisms (6), and the dissolved oxygen content of fish habitat (7).

The exposure to MeHg presents a risk for human health, owing to its teratogenic, immunotoxic, and, especially, neurotoxic effects (3). The lipophilic character of MeHg facilitates its absorption and the passage through hematoencephalic, placental, and mammary barriers.

Selenium is an essential micronutrient for humans being a constituent of enzymes (such as glutathione peroxidase and 1-iodothyronine 5'-deiodinase). It is also well known for its potential in disease prevention (8). Among the effects reported in the area of health promotion, its role in decreasing cancer risk (8,9) and several types of diseases, such as cardiovascular, Keshan and Kashin–Bek diseases, as well as liver necrosis (10,11), should be stressed.

Selenium is also a well-known antagonist of mercury toxicity (10,12). The way in which selenium interferes with MeHg is still unknown, and several mechanisms have been proposed to explain this interaction; however, none of them is conclusive (13). Among the hypotheses, some are more likely to occur: (1) Se may promote a redistribution of MeHg from more sensitive organs (CNS, kidney) to others less sensitive (muscle); (2) competition of Se for the same receptors; (3) formation of complexes (such as tiemannite) (14); and (4) promotion of MeHg conversion into less toxic forms and prevention of oxidative damage (15).

Among the species of Se, selenomethionine is one of the species of Se of most interest for human health because it has the highest rate of absorp-



tion and retention in tissues, and the highest level of incorporation into enzymes and proteins (10,16). Furthermore, it represents the major nutritional source of selenium for higher animals and humans (16).

Mercury and selenium in foods have mostly been determined at the trace level using spectrophotometric techniques (ETAAS, HGAAS, CVAAS, HGAFS, and CVAFS), which are preferred because of their low detection limits (17–19). It is well known that the toxicity, bioavailability, and environmental mobility of metals are strongly dependent on their chemical forms. Thus, analytical speciation has been gaining increasing importance, especially when organic and inorganic forms of the same element can be present in foods, because different forms of an element can have different toxic or protective effects in living organisms. To the best of our knowledge, never before has speciation of selenium and mercury been carried out on the same sample. Overall, food safety and nutritional quality depend on the determination of total levels as well of speciation of the trace elements that exist in foodstuffs.

Risk assessment and prevention of human exposure to MeHg is a strong objective in food safety but unfounded warnings to consumers should be avoided, because of the high nutritional value of fish. Instead, consumers should be provided a clear information, supported by research, about the risk of food consumption.

The main goal of this work was to measure the concentration of mercury and selenium, including MeHg and SeMet, in fish commonly consumed in Spain and Portugal.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

### *Instrumentation*

An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Merlin 10.023, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) was used to determine the total mercury content. Mercury vapor was generated in a flow injection system consisting of a multichannel peristaltic pump, a six-way injection valve, and a gas–liquid separator.

A gas chromatograph (Perkin Elmer, Ltd. model 8410, England) was hyphenated to the AFS detector for the speciation of organomercury compounds. Separation of organomercury compounds was carried out in a gas chromatograph with an on-column injector. The chromatograph was fitted with a non-polar capillary fused silica column SGL-1 (15 m × 0.53 mm id) coated with 1.5 μm dimethylpolysiloxane (Sugelabor S.A. Spain). A pyrolyzer unit 10.558 (P.S., Analytical, Kent, UK) was used as the interface between GC and AFS in order to convert the organomercurial compounds to atomic mercury vapor. An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Excalibur, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) was used to determine the total selenium content. Selenium hydride was

generated in a flow-injection system consisting of a multichannel peristaltic pump, a six-way injection valve, and a gas-liquid separator. An inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, HP-4500 Plus, Tokyo, Japan) fitted with a Babington nebulizer and a Scott double-pass spray chamber was used for selenium detection after chromatographic separation. A CM4000 HPLC pump (Milton Roy, Riviera Beach, FL, USA) fitted with a six-port sample injection valve (model 7725i, Rheodyne) with a 100  $\mu\text{L}$  injection loop was used for chromatographic experiments. Separations were carried out in a Hamilton PRP-X200 (10 mm,  $250 \times 4.1$  mm id) (Reno, NV, USA) for cationic chromatography. For molecular-weight fractionation, 10 kDa cut-off filters (Millipore, Bedford, MA, USA) and an Eppendorf (Hamburg, Germany) Centrifuge 5804, F34-6-38 were used.

### Reagents

All reagents were of analytical grade and were used without further purification. Mercury standard solutions were prepared by dilution of a stock mercury(II) solution (1000 mg  $\text{L}^{-1}$ ) (Merck) in deionized Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA). Standard stock solutions of 1000 mg  $\text{L}^{-1}$  of methylmercury chloride, dimethylmercury, and ethylmercury chloride (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) were prepared in methanol (HPLC grade, Scharlau). These solutions were stored in amber vials at  $-18^\circ\text{C}$  and diluted with methylene chloride (HPLC grade, Scharlau) to obtain working standards. Standards were prepared daily to reduce the risk of mercury volatilization.

Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenite and sodium selenate (Merck, Darmstadt, Germany) in deionized Milli-Q water (Millipore). Selenocystine and selenomethionine (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 3% hydrochloric acid and deionized Milli-Q water, respectively. Trimethylselenonium chloride was synthesized in our laboratory following the procedure of Palmer et al. (20). Stock solutions of 10 mg  $\text{L}^{-1}$  were stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$ . Working standard solutions were prepared daily by dilution.

Stannous chloride 3% (w/v), used as a reducing agent, was prepared by dissolving stannous chloride dehydrate (Merck, Darmstadt, Germany) in concentrated hydrochloric acid and diluted to volume with ultra-pure water to a 3 mol  $\text{L}^{-1}$  concentration. Reagent solution for the reduction was prepared daily to reduce hydrolysis of stannous chloride and maintain the efficiency of mercury reduction.

An acidified solution of potassium bromide [18% (m/v) in 0.5% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Scharlau)], 1 mol  $\text{L}^{-1}$  copper (II) sulfate, and 0.01 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , were used in sample preparation for mercury speciation.

For HG-AFS studies, 1% sodium borohydride solution in 0.3% sodium hydroxide (Merck) was prepared. For LC-ICP-MS studies, the mobile phase was 4 mmol  $\text{L}^{-1}$  pyridine formate in 3% methanol. The elu-

ent was prepared by diluting commercial pyridine (Merck) with distilled water and adjusting the pH to 2.8 or 4.7 with formic acid (Merck). HPLC-grade methanol was purchased from SDS (Barcelona, Spain). For the enzymatic hydrolysis procedure, TRIS-HCl buffer (pH 7.5) and the non-specific protease XIV (*Streptomyces griseus*) (Merck) were used.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) were used for acid digestion of samples. Helium c-50 was used as a carrier gas and argon c-50 was used as a make up gas and sheath gas at the transfer line and the AFS, respectively (Carbueros Metálicos, Spain).

## SAMPLES

Fish samples: mackerel shad (*Trachurus trachurus*), octopus (*Octopus vulgaris*), swordfish (*Aphanopus carbo*), sardine (*Sardina pilchardus*), and tuna (*Thunnus* spp.) were collected on docks (Sesimbra, Portugal) just before delivery to consumers or purchased in a local market following the recommendations of European Commission 2001/22/CE (JO CE, 2001). The skin and bones were removed, then the edible (muscle) portions of fishes were immediately blended and frozen at -70°C. Analyses were performed avoiding UV radiation, owing to its detrimental effects on organomercurials. The results were validated using two certified reference materials: tuna tissue CRM-463 certified for methylmercury ( $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ ), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR), and Antarctic krill Murst-ISS A22, certified for selenium ( $7.37 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$ ), from Institute for Reference Materials and Measurements.

## PROCEDURES

Figure 1 briefly describes an overview of the procedure for total mercury and selenium determination and further speciation.

### *Total Mercury Quantification*

Fish tissues (0.5 g of wet fish or 0.2 g of dry fish) were digested with 2–5 mL of nitric acid and 0.5 mL of hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 43% power output. The pressure was kept at 20 psi during 15 min, increased to 40 psi during 30 min and kept during 1 h at 85 psi. Total mercury concentration was determined by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by the continuous mercury cold vapor system connected to AFS equipment. A flow rate of  $2.5 \text{ mL min}^{-1}$  (3 M HCl) and a similar flow rate of the reductant solution (3% SnCl<sub>2</sub> in 15% HCl) were used to generate the mercury cold vapor.

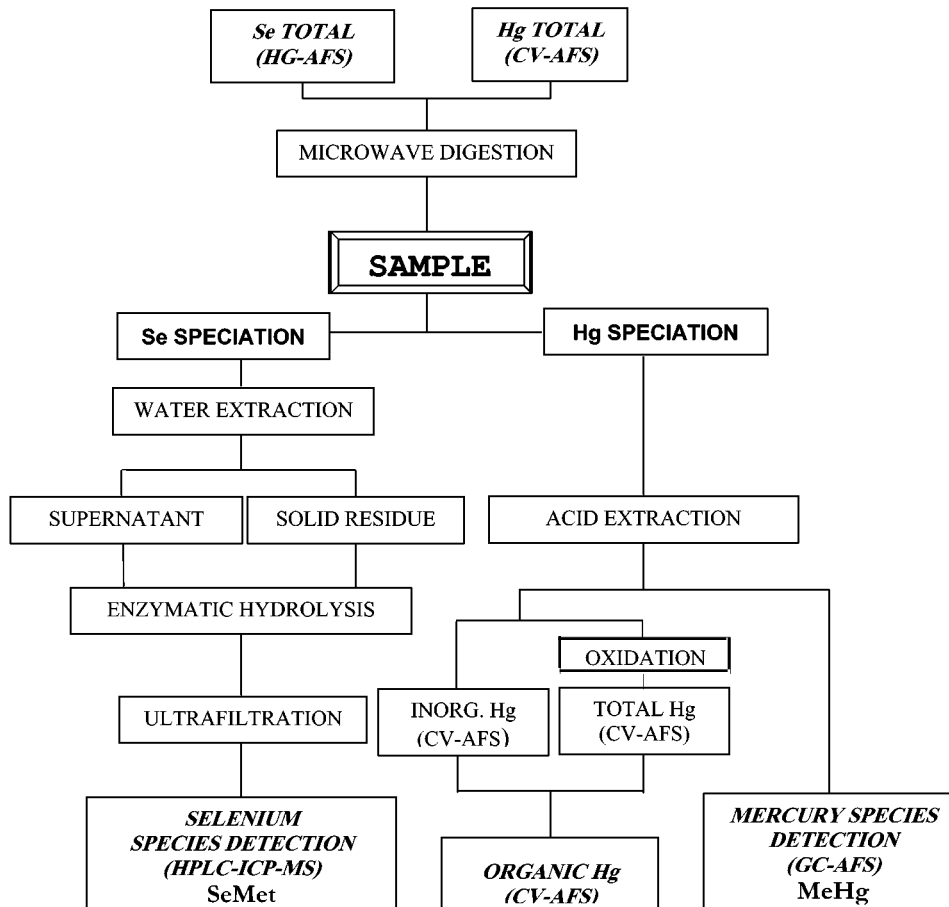


Fig. 1. Flow chart of the sample treatments used for mercury and selenium speciation in fish samples.

## Mercury Speciation

### Acid Extraction

Five milliliters of 5 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid were added to a portion (300 mg) of fish tissue and sonicated for 5 min.

### Mercury Speciation

After neutralization, mercury species of the hydrochloric acid extracts were converted into their bromide derivatives (RHgBr) by the addition of 3 mL of a solution containing 18% (w/v) potassium bromide, 5% (w/v) sulfuric acid, and 1 mL of 1 mol L<sup>-1</sup> copper sulphate.

Extraction of organomercury species into the organic phase was carried out by adding 5 mL of methylene chloride and shaking the solution for 5 h. A 4 mL aliquot of the organic solvent layer containing the extracted

organomercury was transferred to a glass vial, and a 1 mL of 0.01 mol L<sup>-1</sup> sodium thiosulfate solution was added. The solution was mixed for 20 min and subsequently centrifuged at 1575g.

An aqueous layer (800 µL) was placed in a 3 mL polyethylene vial and 300 µL of KBr/CuSO<sub>4</sub> and 300 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added. Each vial was manually shaken for 1 min, centrifuged, and 0.1–0.2 mL of the organic solvent was extracted.

### *Detection*

Speciation of organic mercury was attained on the organic extract with the coupling GC-pyrolyser-AFS.

Helium with a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup> was used as the carrier gas. The temperatures were 250°C for the injector and 40°C with a ramp of 15°C min<sup>-1</sup> until 200°C for the oven.

For the AFS detection, argon was used as make-up gas and sheath gas at flows of 60 and 300 mL min<sup>-1</sup>, respectively.

### *Total Organomercury Determination*

After acid extraction total organomercury content in the supernatants was determined by difference between its total mercury content (after digestion with HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and its inorganic mercury content, by using stannous chloride as a selective reductant.

### *Total Selenium Quantification*

The samples for selenium determination followed the same acid digestion as mentioned for total mercury quantification. Se(VI) was reduced to Se (IV) by adding concentrated hydrochloric acid (6 mol L<sup>-1</sup> final concentration) to the digest and heating at 95°C for 1 h. The solutions were then diluted to 25 mL with Milli-Q-water.

Total selenium concentration was determined by the continuous selenium hydride system connected to AFS equipment. A flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup> (3 M hydrochloric acid) and a similar flow rate of the reductant solution (1% sodium tetrahydroborate w/v) were used to generate the selenium hydride.

### *Selenium Speciation*

Portions (200 mg) of dry fish were enzymatically hydrolyzed following a previously developed method (21) (hydrolysis of water-soluble fraction and its solid residue at pH=7.5), but using the non-specific protease (*Streptomyces griseus*, Pronase E) instead of Subtilisin.

In order to enhance the clean up, the extracts were processed through 10 kDa mass cut-off filters. Finally, the filtrates were diluted to 10 mL and analyzed by cation exchange chromatography coupled to ICP-MS, under the following operating conditions: coolant Ar flow rate: 15.0 L min<sup>-1</sup>;

auxiliary Ar flow rate: 1.1 L min<sup>-1</sup>; nebulization Ar flow rate: 1.3 L min<sup>-1</sup>; sample flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup>; nebulizer type: Babington. For this purpose a Hamilton PRP-X200 cationic exchange column using 4 mM pyridine at pH 2.8 and 4.7 as a mobile phase was evaluated. The analytical peaks were evaluated in terms of peak area by the standard addition method at *m/z* 82 and 78.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Total Mercury Determination*

Total mercury content of the samples was determined by FI-CV-AFS in order to evaluate the mercury exposure through fish consumption. Mercury concentration in marine tissue showed the following gradation: octopus (0.024 µg g<sup>-1</sup>) < mackerel shad (0.33 µg g<sup>-1</sup>) < sardine (0.048 µg g<sup>-1</sup>) < tuna (0.31 µg g<sup>-1</sup>) < swordfish (0.47 µg g<sup>-1</sup>) (Table 1). Such variability might be explained by the interference of biotic parameters such as age, size, sex, metabolism, and feeding habits (4–6) that affect the bioaccumulative process of Hg in fish.

All these values are within the European Commission Regulations 466/2001 and 221/2002 (22,23), which forms part of EC food hygiene legislation, and sets the maximum limit for mercury in whole fresh fish at 0.5 mg kg<sup>-1</sup>, except mainly for predatory species, which may have higher mercury concentration (1.0 mg kg<sup>-1</sup>). The value for mercury for these three species was comparable with other Hg data found in fish (24–26).

The accuracy of this method was evaluated by analyzing a marine tissue reference material (CRM 463, tuna fish). Because, at 95% confidence level, no significant differences were detected between the certified value and the experimental one, the method used was considered accurate for total mercury determination.

### *Mercury Species Analysis*

Several procedures based on alkaline digestion have been used for the analysis of mercury speciation, but occasionally have shown overestimation of methylmercury concentration (27–28). Therefore, to perform mercury species extraction, acid extraction (hydrochloric acid) combined with an ultrasound bath extraction was selected. Several variables, such as acid concentration (0–7 M), volume of extractant (0–7 mL), reagents, and sonication exposure time (0–15 min), were previously optimized.

Once total mercury extraction was carried out, determination of inorganic and total mercury was achieved in the acid extract by CV-AFS. The results obtained showed that organomercury compounds comprised more than 94% from the total mercury occurring in fish samples. This may be explained because of the concurrent MeHg bioamplification phenomena

Table 1  
Total Mercury and Selenium Concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Found in Fish Samples by CV-AFS and HG-AFS

Sample	Moisture (%)	Total Hg fresh weight ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total Hg dry weight ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total Se fresh weight ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total Se dry weight ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Se:Hg Molar ratio
Mackerel shad	80	$0.033 \pm 0.001$	$0.172 \pm 0.007$	$0.26 \pm 0.01$	$1.28 \pm 0.02$	20
Octopus	79	$0.024 \pm 0.001$	$0.111 \pm 0.005$	$0.13 \pm 0.01$	$0.59 \pm 0.02$	13
Swordfish	78	$0.47 \pm 0.02$	$2.05 \pm 0.04$	$0.47 \pm 0.02$	$2.09 \pm 0.04$	3
Sardine	76	$0.048 \pm 0.002$	$0.21 \pm 0.01$	$0.43 \pm 0.02$	$1.81 \pm 0.02$	22
Tuna	60	$0.31 \pm 0.01$	$0.73 \pm 0.03$	$0.92 \pm 0.01$	$2.32 \pm 0.03$	8
CRM-463 <sup>a</sup>	3	--	$2.87 \pm 0.07$	--	--	--
Murst-ISS A2 <sup>b</sup>	2	--	--	--	$7.42 \pm 0.5$	--

<sup>a</sup> Certified value:  $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ .

<sup>b</sup> Certified value:  $7.37 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$ .

<sup>c</sup> Results expressed as mean value  $\pm$  standard deviation, n=6.

through the tropic chain and the high specificity of the intestine wall of fishes toward MeHg absorption (29).

In order to evaluate the organomercury compounds, after applying the HCl extraction procedure, mercury speciation of the extracts with gas chromatography coupled to pyrolysis with atomic fluorescence detection was carried out.

A chromatographic analysis was performed on different fish samples and only MeHg was detected. This fact is in good agreement with the literature, where MeHg is the only organomercury compound found in fish (1).

The results of the speciation analysis for swordfish, tuna, and CRM-463 were  $1.8 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $0.72 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ , and  $2.8 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ . It can be stated that MeHg was found to be the dominant Hg species in all the samples analyzed. Depending on the fish, the amount of mercury found varies, but the percentage of MeHg is higher than 93% in all the samples. This fact was in agreement with the value provided previously for the total organomercury compound.

The proposed HCl extraction GC-AFS method provided a limit of detection for methylmercury of 1.2 pg, calculated as three times the standard deviation of 10 blank measures.

The method was validated by the analysis of the standard reference material, CRM 463 tuna fish. No significant differences were found between the certified value and the one provided by the acid leaching method (GC-AFS) at 95% confidence level.

### **Total Selenium Determination**

Total selenium content of the fish samples was determined in order to evaluate the Se exposure of fish consumers. The results obtained are shown in Table 1. Selenium concentration in the muscle tissue did not vary to the same extent as the mercury levels did. Mean selenium concentration in marine tissue ranged from  $0.13 \mu\text{g g}^{-1}$  in octopus to  $0.92 \mu\text{g g}^{-1}$  in tuna. Swordfish and sardine had a similar Se content; however, tuna doubled this amount. Selenium concentration for these three species was comparable with other Se data found in fish (26,30,31).

Even though swordfish and sardine had similar Se content, the molar ratio Se:Hg varies from 3 (swordfish) to 22 (sardine).

The accuracy of the method was evaluated by analyzing a marine tissue reference material (Murst-ISS A2). Because, at 95% confidence level, no significant differences were detected between the certified value and the experimental one, the method used was considered accurate for total selenium determination.

### **Selenium Species Analysis**

To date, very few Se speciation studies have been carried out in marine organisms, most of them concerning with oysters (21), cod (30),



and tuna (31). However, no data about  $\text{Se}_{\text{species}}:\text{Hg}_{\text{species}}$  ratio in fish has been reported to our knowledge.

Generally, the use of enzymatic hydrolysis processes has shown better results in the release of selenium species from biological solid samples (21) than basic (tetramethylammonium hydroxide) or acid (hydrochloric acid) hydrolysis that led to selenium species degradation (32,33). Because of this, selenium species extraction was performed following an enzymatic procedure.

Se may be present in food sample as inorganic forms (selenite or selenate) or as seleno amino acids (free or forming part of the protein structures). The aqueous extraction may free the weakly bound inorganic Se and soluble seleno amino acids. On the other hand, the enzymatic hydrolysis of biological samples produces free amino acids and peptides of different sizes because of the cleavage of peptide bonds in proteins.

After an aqueous extraction, it was found that the percentage of soluble selenium was between 6% and 8% of total concentration, the rest of the selenium was found in the solid fraction.

After the enzymatic hydrolysis, total selenium contents were analyzed before and after passing through the 10 kDa cut-off filters in order to evaluate if there were selenium compounds retained in the filters. For swordfish, selenium recoveries ranged from 90% to 97%, which indicates that the molecular weight of most of the selenium species extracted during the hydrolysis are lower than 10 kDa. When tuna and sardine were analyzed, the recovery ranged from 65% to 75%, respectively, which means that the hydrolysis was not as effective in breaking down the peptides or proteins in smaller fractions as it was for swordfish, so some selenium may remain in peptide form. This speculation stems from the knowledge that in the enzymatic hydrolysis of proteins, some peptide bonds can remain intact depending on the cleavage specificity of the enzyme (34). Therefore, in this type of fish, a selenium fraction with a molecular weight higher than 10 kDa remained after the enzymatic hydrolysis step.

To ensure that no selenium compounds lower than 10 kDa were retained in the filters, we determined the total selenium content in the extracts (spiked with the standards) after filtration. The results, with an average recovery of 95–98% of total selenium, showed that selenium losses did not occur with this sample treatment.

### ***Qualitative Analysis of Selenium Species***

Some analytical methods for separation and quantification for organic and inorganic selenium species have been proposed (35). Generally, ionic exchange liquid chromatography is used for the separation of seleno amino acids and inorganic selenium species, owing to a number of potential benefits [minimal preparation of liquid samples, separation at ambient temperatures avoiding the risk of thermal decomposition of labile compounds (36), and remaining of their ionic properties in a wide pH range].

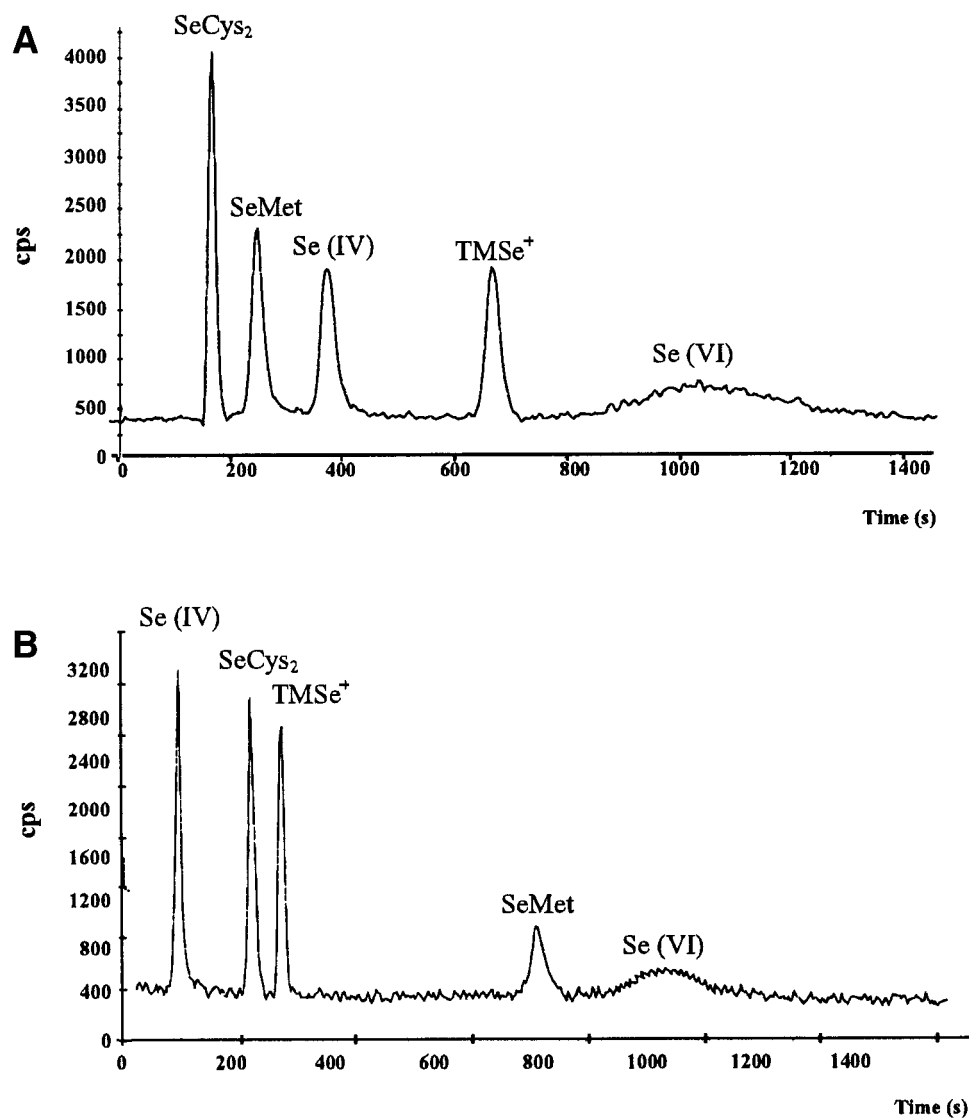


Fig. 2. Chromatograms of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of Se species obtained for cationic exchange chromatography at two pH values: (A) 4.7 and (B) 2.8.

In this study, five standard Se compound and two mobile phases were tested for Se separation by a cationic exchange column. If a species is identified under two different chromatographic conditions, its identity can be more certainly stated. Because of this, different experiments were carried out to provide good resolution for standard solutions using two different mobile phases at different pH values. A pH value studied previously (2.8) (19) and a new one (4.7) were used. A standard chromatogram for both pHs is shown in Fig. 2 and the limits of detection (LODs) of the

Table 2  
Limits of Detection of the Cation Exchange Chromatographic  
Methods used for Selenium Speciation Analysis  
(Injection Volume 100  $\mu$ L)

Species	pH 2.8		pH 4.7	
	LOD (Se/ng)	RSD (%)	LOD (Se/ng)	RSD (%)
TMSe <sup>+</sup>	0.1	3	0.1	2
SeCys <sub>2</sub>	0.1	3	0.2	2
SeMet	0.4	3	0.3	3
Se(IV)	0.2	2	0.15	2
Se(VI)	0.5	4	0.6	3

two chromatographic methods are shown in Table 2. Under the optimal chromatographic conditions, it is possible to identify these species within 20 minutes.

A chromatographic analysis was performed on three different fish samples. Figures 3 and 4 show the chromatograms obtained for these samples (water-soluble fraction and solid residue) analyzed. Two peaks can be differentiated in each of the evaluated samples. The first peak was unidentified; it could not be attributed to any of the selenium species tested, so it could correspond to any anionic selenium species that elutes in the dead volume. The second peak was identified as SeMet, the only seleno amino acid found in both extracts and the dominant Se-species in the three samples. The identification of the peaks was carried out by the spiking procedure. The same chromatographic profiles were obtained by the two chromatographic methods used (at pH 2.8 and 4.7).

According to the literature, SeMet is the main form of Se found in food (16,37,38). Therefore, the majority of Se in plant and animal material consumed by humans will be in the form of SeMet (39). Because SeMet cannot be synthesized by higher animals and humans, it could have beneficial physiologic effects not shared by other selenium compounds and meet the criteria of an essential amino acid (16). Only SeMet is incorporated into body proteins, and this allows Se to be stored in the organism and reversibly released by normal metabolic processes, thus offering an advantage over other Se compounds (37). In addition, organic Se appears to be more bioavailable and maintains higher post-supplementation levels (38).

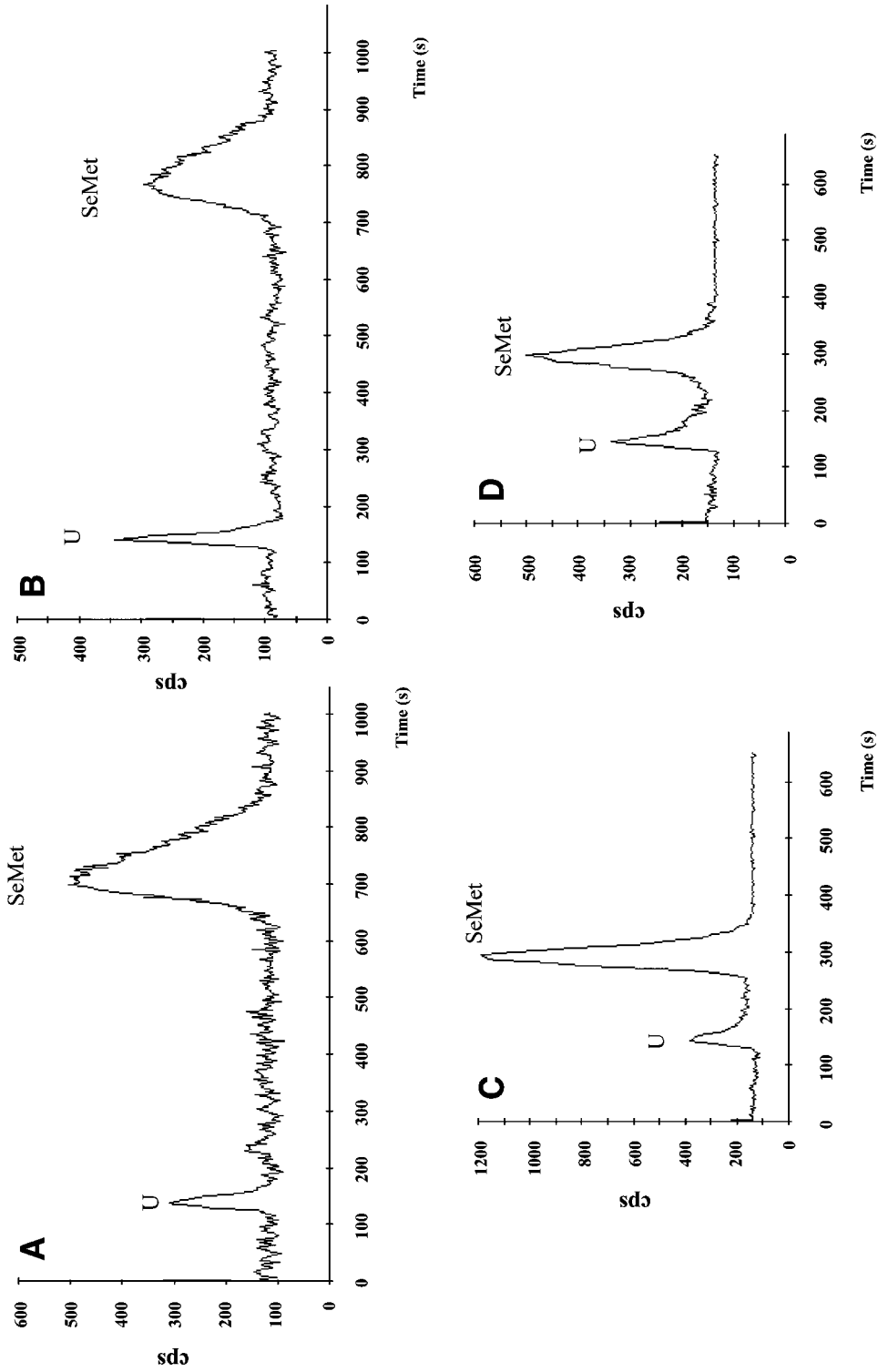


Fig. 3. Chromatograms of Se species found in sardine after enzymatic hydrolysis and 10 kDa ultrafiltration in: the solid residue (A) pH 2.8, (C) pH 4.7, and in the water-soluble fraction (B) pH 2.8 and (D) pH 4.7. U= unidentified Se species.

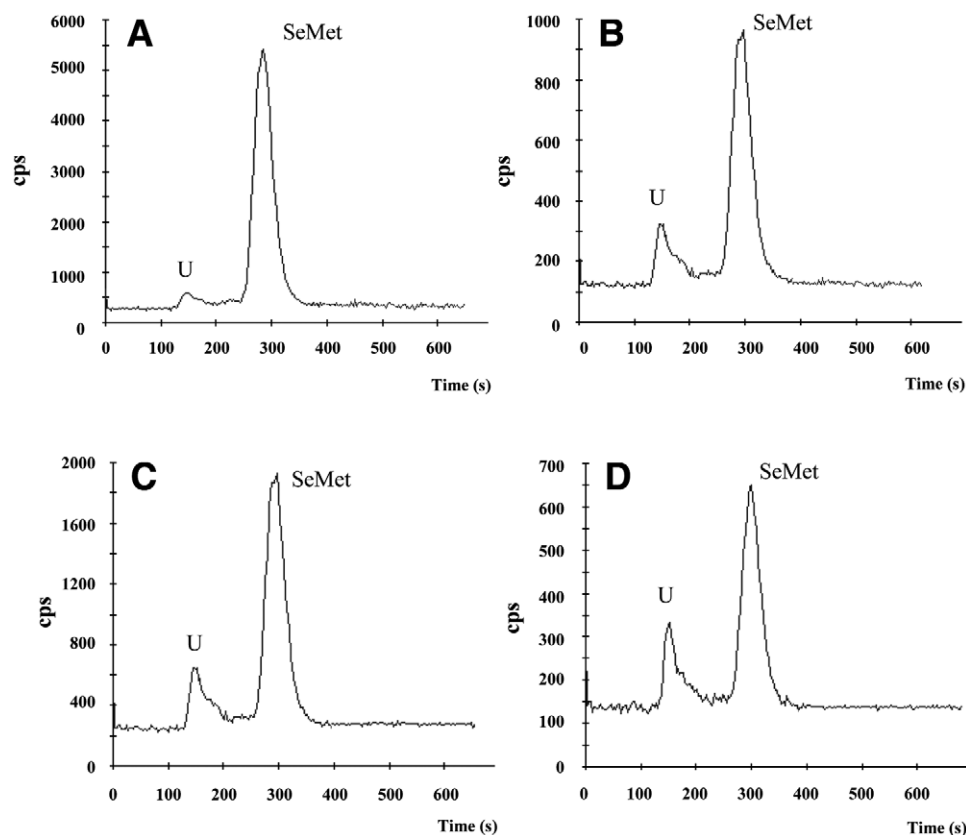


Fig. 4. Chromatograms of Se species found after enzymatic hydrolysis and 10 kDa ultrafiltration in the solid residue of: (A) swordfish, (C) tuna and in the water-soluble fraction of (B) swordfish and (D) tuna. U= unidentified Se species. Cationic exchange chromatography at pH 4.7.

### Quantitative Analysis of Selenium Species

The results of speciation analysis of fish samples are shown in Table 3. The amount of SeMet varied depending on the type of fish. In the swordfish, 93% of the total Se has been found to be SeMet, on the other hand, tuna and sardine present lower percentage of SeMet (46% and 28%, respectively). The value for SeMet for these species was comparable with other SeMet data found in marine samples [e.g, oyster (47%)(21)] Consequently, the selenium levels found may not only help to achieve the recommended daily amount but provide a rich dietary source of SeMet.

In spite of the fact that the highest SeMet content has been found in the swordfish, it can also be seen that the highest value of the SeMet:MeHg ratio (6.3), as well as the Se:Hg ratio (22) is for sardine, and the lowest one for swordfish (3).

Table 3  
SeMet Concentration Found in Both Soluble and Non-soluble Fractions  
after Enzymatic Hydrolysis of Fish Samples

Sample	SeMet (water-soluble fraction) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SeMet (solid residue) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total SeMet ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SeMet:MeHg Molar ratio
Swordfish	$0.090 \pm 0.007$	$1.86 \pm 0.12$	$1.95 \pm 0.12$	2.7
Sardine	$0.11 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.02$	$0.51 \pm 0.02$	6.3
Tuna	$0.11 \pm 0.01$	$0.96 \pm 0.03$	$1.07 \pm 0.03$	3.8

<sup>a</sup> Results expressed as mean value  $\pm$  standard deviation,  $n=6$ .

## CONCLUSIONS

The goal of this study was to obtain information about mercury contamination in fish highly consumed in Spain and Portugal to establish future actions on exposure assessment resulting from fish ingestion.

The levels of total mercury found in the fish samples analyzed vary to a large extent depending on the species, and are below the maximum level allowed by the European legislation. The results also showed that more than 93% of the total Hg occurring in fish samples was methylmercury.

On the other hand, it can therefore be stated that the average concentrations of selenium did not vary to the same extent as the mercury levels did, and that they are important to ensure the recommended daily amount.

SeMet was the only selenium compound found in the three fish species (sardine, swordfish, and tuna) after an enzymatic hydrolysis process. Nevertheless, the SeMet:MeHg ratio in the different species of fish differs substantially.

The ratio Se:Hg varied from 3 (swordfish) to 22 (sardine) with a more favorable ratio between SeMet and MeHg in the sardines. Sardine consumption thus seem to be preferable over tuna and swordfish.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Spanish-Portuguese Integrated Actions (HP2000-0049 and 2001/2002 N°E-13/01) and by the projects CICYT PB98-

0768 and FCT Sapiens 2001 (POCTI/ESP/41741/2001, Eixo 2, Medida 2.3). The collaboration of P.Margarido and G.Silva from DSHPV (Fisheries Division) in obtaining samples is gratefully acknowledged. One of the authors (A. Cabañero) wishes to thank the Complutense University for support through a predoctoral fellowship.

## REFERENCES

1. Y. Cai and J. M. Bayona, Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **696**, 113–122 (1995).
2. S. Río-Segade and C. Bendicho, Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection-cold vapor technique, *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 263–268 (1998).
3. World Health Organization, Geneva. Environmental Health Criteria, *Methylmercury*, 101, IPCS (1990).
4. P. Larsens, M. Leermarkers, and W. Baeyens, Determination of methylmercury in fish by headspace-gas chromatography with microwave-induced-plasma detection, *Water Air Soil Poll.* **56**, 103–115 (1991).
5. T. M. Grieb, C. T. Briscoll, S. P. Gloss, C. L. Schofield, G. L. Bowie, and D. B. Pordello, Factors affecting Hg accumulation in fish in the upper Michigan Peninsula, *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 919–930 (1990).
6. N. S. Bloom, Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapor atomic fluorescence detection, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 1010–1017 (1992).
7. R. P. Mason and W. F. Fitzgerald, Alkylmercury species in the equatorial Pacific, *Nature* **347**, 457–459 (1990).
8. K. Pyrzynska, Analysis of selenium species by capillary electrophoresis, *Talanta* **55**, 657–667 (2001).
9. C. F. Combs and W. P. Gray, Chemopreventive agents: selenium, *Pharmacol. Ther.* **79**, 179–192 (1998).
10. L. Ebdon, L. Pitts, R. Cornelis, H. Crews, O. F. X Donard, and P. Quevalliller, *Trace Element Speciation for Environment and Health*, 1st ed., RSC, Cambridge, UK (2001).
11. M. Navarro-Alarcón and M. C. López-Martínez, Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases, *The Sci. Total Environ.* **249**, 347–371 (2000).
12. G. M. Egeland and J. P. Middaugh, Balancing fish consumption benefits with mercury exposure, *Science* **278**, 1904–1905 (1997).
13. M. A. A. Cuvín-Aralar and R. W. Furness, Mercury and selenium interaction: a review, *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **21**, 348–364 (1991).
14. K. Das, V. Jacob, and J. M. Bouqueneau, White-sided dolphin metallothioneins: purification, characterisation and potential role, *Comparat. Biochem. Physiol. Part C* **131**, 245–251 (2002).
15. D. J. Hoffman and G. H. Heinz, Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in mallard ducks, *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 161–166 (1998).
16. G. N. Schrauzer, The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine, *Advanc. Food Nutr. Research* **47**, 73–112 (2003).
17. S. Río-Segade and C. Bendicho, Selective reduction method for separate determination of inorganic and total mercury in mussel tissue by flow-injection cold vapor technique, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **42**, 245–255 (1998).

18. L. Aduna de Paz, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, and M. J. Lagarda, Determination of mercury in dry-fish samples by microwave digestion and flow injection analysis system cold vapor atomic absorption spectrometry, *Food Chem.* **58**, 169–172 (1997).
19. M. Kotrebai, M. Birringer, J. F. Tyson, E. Block, and P. C. Uden, Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents, *Analyst* **125**, 71–77 (2000).
20. I. S. Palmer, D. D. Fisher, A. W. Halverson, and O. E. Olson, Identification of a major selenium excretory product in rat urine, *Biochem. Biophys. Acta* **177**, 336–342 (1969).
21. P. Moreno, M. A. Quijano, A. M. Gutiérrez, M. C. Pérez-Conde, and C. Cámara, Fractionation studies of selenium compounds from oysters, and their determination by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 1044–1050 (2001).
22. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (2001).
23. Commission Regulation (EC) No 221/2002 of 6 February 2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (2002).
24. C. R. Joiris, L. Holsbeek, and N. L. Moatemi, Total and methylmercury in sardines *Sardinella aurita* and *Sardina pilchardus* from Tunisia, *Marine Pollution Bulletin* **38**, 188–192 (1999).
25. A. V. Holden, Mercury in fish and selfish. A review, *J. Food Technol.* **8**, 1–25 (1973).
26. M. Plessi, D. Bertelli, and A. Monzani, Mercury and selenium content in selected seafood, *J. Food Comp. Anal.* **14**, 461–467 (2001).
27. T. Quiang, J. Qian, and W. Frech, Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solven extraction, *J. Anal. At. Spectrom.* **15**, 1583–1588 (2000).
28. H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilger, and R. D. Evans, Determination of artifactual formation of monomethylmercury ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) in environmental samples using stable  $\text{Hg}^{2+}$  isotopes with ICP MS detection: calculation of contents applying species specific isotope addition, *Fresenius J. Anal. Chem.* **358**, 363–370 (1997).
29. F. M. Morel, A. M. L. Kraepiel, and M. Amyot, The chemical cycle and bioaccumulation of mercury, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**, 543–566 (1998).
30. H. M. Crews, P. A. Clarke, D. J. Lewis, L. M. Owen, and P. R. Strutt, Investigation of selenium speciation in *in vitro* gastrointestinal extracts of cooked cod by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **11**, 1177–1182 (1996).
31. M. Yoshida, M. Abe, K. Fukunaga, and K. Kkuchi, Bioavailability of selenium in the defatted dark muscle of tuna, *Food Additives Contaminants* **10**, 990–995 (2002).
32. M. B. De la Calle-Guntiñas, C. Brunori, R. Scerbo, et al., Determination of selenomethionine in wheat samples: comparison of gas chromatography-microwave-induced plasma atomic emission spectrometry, gas chromatography-flame photometric detection and gas chromatography-mass spectrometry *J. Anal. At. Spectrom.* **9**, 1041–1047 (1997).
33. M. A. Palacios, A. Varga, M. Gómez, C. Cámara, and F. Gavilanes, Evaluation of acid hydrolysis of proteins on Se-aminoacids and trimethylselenonium species by liquid chromatography-microwave digestion-hydride generation-atomic absorption spectrometry, *Quim. Anal.* **18**, 163–168 (1999).
34. F. R. Abou-Shakra, M. P. Rayman, N. I. Ward, V. Hotton, and G. Bastina, Enzymatic digestion for the determination of trace elements in blood serum by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, 429–433 (1997).
35. M. Kotrebai, S. M. Bird, J. F. Tyson, E. Block, and P. C. Uden, Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry and by referenced electrospray ioniza-



- tion-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* **54**, 1573–1591 (1999).
36. T. Guerin and A. Astruc, Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques, *Talanta* **50**, 1–24 (1999).
  37. G. N. Schrauzer, Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity, *J. Nutrition* **130**, 1653–1656 (2000).
  38. A. Daniels, Selenium metabolism and bioavailability, *Biol. Trace Elem. Res.* **18**, 185–199 (1996).
  39. R. A. Sunde, Selenium, in *Handbook on Nutritionally Essential Mineral Elements*, B. L. O'Dell and R. A. Sunde, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 493–556 (1997).

**2. DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SELENIO TOTAL Y SUS ESPECIES BIOACCESIBLES EN MUESTRAS DE PESCADO MEDIANTE UN MÉTODO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* Y POSTERIOR DETECCIÓN CON CV-AFS, HG-AFS, GC-PYRO-AFS Y HPLC-ICP-MS, RESPECTIVAMENTE.**

A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara.

“Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method”

***Anal. Chim. Acta***, 2004, 526, 51-61.

El trabajo completo se presentó como poster en “5<sup>th</sup> International Symposium on Speciation of Elements in Biological, Environmental and Toxicological Sciences”, Almuñecar. 12-15 de Septiembre 2003.

# Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method

Ana I. Cabañero, Yolanda Madrid, Carmen Cámara\*

*Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain*

Received 25 June 2004; received in revised form 15 September 2004; accepted 15 September 2004  
Available online 28 October 2004

## Abstract

The assessment of hazard from selenium (Se) and mercury (Hg) contaminants in the food chain based on their potential bioaccessibility and on estimate of their actual content in fish is reported under an in vitro model. Atomic fluorescence spectroscopy (AFS) was applied for total selenium and mercury quantification. Selenium and mercury bioaccessibility varied depending on the type of fish analyzed. Se solubility in the gastrointestinal supernatants was higher in swordfish and sardine (76 and 83%, respectively) than in tuna (50%). A low Hg bioaccessibility (9–17%) was found for all the samples.

Simulated human gastric and intestinal digestion led to the identification of selenomethionine (SeMet) and organic mercury in the three digested fish. Furthermore, these species were not modified during the digestion. Speciation of selenium compounds was done by liquid chromatography in conjunction with inductively coupled plasma mass spectrometry (LC–ICP–MS).

Sardine had the most favorable Se:Hg, [Se:Hg]<sub>bioaccessible</sub> and [SeMet:Hg]<sub>bioaccessible</sub> molar ratios, making it preferable to tuna and swordfish.

The effect of cooking was also evaluated.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Selenium; Mercury; Speciation; Bioaccessibility; Fish sample

## 1. Introduction

The high nutritional value of fish in terms of minerals (P, I, K), unsaturated lipids (oleic acid, linolenic acid and omega 3 series), phospholipids, vitamins (A, D) and proteins of high biological value, makes it an ideal component of a healthy and balanced diet.

In addition to the key nutrients mentioned, fish can accumulate substantial concentrations of heavy metals in their tissues and thus can represent a major dietary source of these elements in humans. Fish is therefore a product for which suitable measures should be taken to provide chemical monitoring of the risks deriving from its consumption.

With the exception of occupational exposure, fish are acknowledged to be the single largest source of mercury for man

[1]. Methylmercury (MeHg) is the organomercury compound most commonly found in fish, and is recognized as a major environmental pollutant and health hazard for humans because of its easy penetration through biological membranes, efficient bioaccumulation, high stability and long-term elimination from tissues [2]. Therefore, the exposure to MeHg poses a risk for human health due to its teratogenic, immunotoxic and, most importantly, neurotoxic effects [3–5].

One of the natural components of fish that may protect against Hg toxicity is selenium [4,5]. Many reports concerned with Se content in food have shown that the most important sources of Se in the diets of most people are fish, meat and cereals [6,7]. In fact, fish and meat appear to make rather stable contributions of Se, generally around 40–50% of the total Se ingested, regardless of the level of total Se ingested [6]. Se appears in food in various forms such as selenite, selenate, selenomethionine and selenocysteine [8–10] and it is considered as an essential trace element for living organisms,

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944146.

E-mail address: [ccamara@quim.ucm.es](mailto:ccamara@quim.ucm.es) (C. Cámara).

including humans, because it forms part of several enzymes such as glutathione peroxidase (GSHPx) and iodothyronine 5'-deiodinase [11].

The evaluation of Hg and Se content in foods has been approached in recent decades from various points of view: estimation of Hg and Se intake, characterization of Hg and Se species, studies of human metabolism, and evaluation of Hg and Se species toxicity in tests with animals and cell cultures. However, to our knowledge, no data on the bioavailability for human beings of Hg and Se presented simultaneously in food have been reported to date.

The total concentration of a mineral micronutrient in food does not provide information about its bioavailability, i.e. the percentage of the ingested amount of the element that can be absorbed during digestion and subsequently transformed into metabolically active species. Since the extent of the toxic effects caused by heavy metals is not governed by their total concentration, but rather regulated by the forms of the metals that can efficiently interact with sites on the biological ligands [12], bioavailability depends largely on the ability of the ultimate physicochemical forms in which elements reach the absorption site, mainly the duodenum, to cross the intestinal barrier. These forms can exist in food and not be modified during digestion, but in most cases, they result from interactions occurring in the gastrointestinal tract between elements and various functional groups of food components [13]. Consequently, only a proportion (sometimes highly variable depending upon the food matrix processing and storage) of these food components is absorbed and utilized [14].

Speciation of a micronutrient in food and in the gastrointestinal tract is essential to the understanding and prediction of its availability for absorption [13]. The differences in absorption, distribution and toxicity between elemental, inorganic and organic mercury and inorganic selenium and organic selenium are such that detailed dietary studies (speciation of dietary components) may be required to establish a full picture of bioavailable intake [9].

While information on the Hg and Se content of foods is reasonably adequate, knowledge of Hg and Se availability is incomplete. This knowledge gap continues because accurate measurement of Hg and Se availability can be difficult, expensive and time consuming [15].

In vivo studies are both expensive and laborious, and the possibility of measuring certain parameters during the experiments is often limited [16]. In contrast, in vitro experiments can be simple, rapid, low in cost and may provide insights not achievable in whole animal studies [15]. Consequently, in vitro experiments offer an appealing alternative to human and animal studies [16].

Nowadays, there are well-established in vitro methods for estimating element solubility in animals [12]. These methods comprise a two-phase simulation of gastrointestinal physiology, the stomachal and intestinal phases [12]. The results from most in vitro methods are based on the formation of digestion products that are soluble and not precipitated by

precipitating agents, or dialyzable [17]. In this way, the bioaccessible fraction is determined, which is the maximum concentration soluble in simulated gastrointestinal media that is available for subsequent processes of absorption into the intestinal mucosa [18]. Knowledge of the concentration of the element in the bioaccessible fraction is indispensable for evaluating bioavailability.

In this work, as part of an ongoing study of Hg and Se bioaccessibility from the human diet, Se and Hg quantification and speciation in fish samples and the subsequent in vitro enzymolysis of the sample to broadly simulate human gastrointestinal digestion were carried out.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Excalibur, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) was used to determine the total selenium content. Selenium hydride was generated in a flow injection system.

An inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, HP-4500 Plus, Tokyo, Japan) fitted with a Babington nebulizer and a Scott double-pass spray chamber was used for selenium species quantification after chromatographic separation.

A CM4000 HPLC pump (Milton Roy, Riviera Beach, FL, USA) fitted with a six-port sample injection valve (model 7725i, Rheodyne) with a 100  $\mu$ L injection loop was used for chromatographic experiments. Separations were carried out in a Hamilton PRP-X200 (10 mm, 250 mm  $\times$  4.1 mm i.d.) (Reno, NV, USA) for cationic exchange chromatography.

For molecular weight fractionation, 10 kDa cut-off filters (Millipore, Bedford, MA, USA) and an Eppendorf (Hamburg, Germany) Centrifuge 5804, F34-6-38 were used.

An atomic fluorescence spectrometer (Merlin 10.023, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) was used to determine the total mercury content. Mercury vapour was generated in a flow injection system. A gas chromatograph (GC, Perkin-Elmer, model 8410, England) was hyphenated to the AFS detector for the speciation of organomercury compounds. Separation of organomercury compounds was carried out in a gas chromatograph with an on-column injector. The chromatograph was fitted with a non-polar capillary fused silica column SGL-1 (15 m  $\times$  0.53 mm i.d.) coated with 1.5  $\mu$ m dimethylpolysiloxane (Sugelabor S.A., Spain).

A pyrolyzer unit 10.558 (P.S., Analytical, Kent, UK) with a temperature control module was used as the interface between GC and AFS in order to convert the organomercurial compounds to atomic mercury vapour.

### 2.2. Reagents

All reagents were of analytical grade and were used without further purification.

Enzymes and bile salts were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): pepsin (Porcine; catalogue no. P-7000), pancreatin (Porcine; catalogue no. P-1750), and bile salts (catalogue no. B-8756).  $\alpha$ -Amylase was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) (catalogue no. 1329).

Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenite and sodium selenate (Merck) in deionised Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA).

Selenomethionine (SeMet) and selenocysteine (SeCys<sub>2</sub>) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) were prepared in doubly distilled water. Hydrochloric acid (3%) was added to dissolve SeCys<sub>2</sub>. Trimethylselenonium chloride was synthesized in our laboratory following the procedure of Palmer et al. [19]. For HG-AFS studies, sodium borohydride (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) was prepared in 0.3% sodium hydroxide (Merck). The 3 M hydrochloric acid solution was prepared by diluting the appropriate volume of concentrated HCl (Merck).

For HPLC–ICP–MS studies, the mobile phase was 4 mM pyridine (Merck) formate in 3% methanol (SDS, Barcelona, Spain).

For the enzymatic hydrolysis procedure, Tris–HCl and the non-specific protease *Streptomyces griseus* (Pronase E) (Merck) were used to prepare the fish tissue samples.

Mercury standard solutions were prepared by dilution of a stock mercury(II) solution (1000 mg L<sup>-1</sup>) (Merck) in deionised Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA). Standard stock solution of 1000 mg L<sup>-1</sup> of methylmercury chloride (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) was prepared in methanol (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, Spain).

For CV-AFS stannous chloride (Merck) was prepared in 3 M HCl daily to reduce hydrolysis of stannous chloride and maintain the efficiency of mercury reduction.

Potassium bromide, copper(II) sulphate and sodium thio-sulphate (Merck) were used in sample preparation for mercury speciation.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) were used for acid digestion of samples.

Helium c-50 was used as a carrier gas and argon c-50 was used as a make-up gas and sheath gas at the transfer line and the AFS, respectively (Carburros Metálicos, Spain).

### 2.3. Samples

**Fish samples:** Swordfish (*Aphanopus carbo*), sardine (*Sardina pilchardus*) and tuna (*Thunnus* spp.) were collected in a Spanish local market. The skin and bones were removed and the edible (muscle) portions of fish immediately blended and frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$ . These tissues were then oven dried at  $40^{\circ}\text{C}$  for 2 days and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Tuna was also analyzed after cooking for consumption in a microwave oven at high power (100%, 650 W) for 4 min. The flesh was homogenized in a blender and maintained at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis.

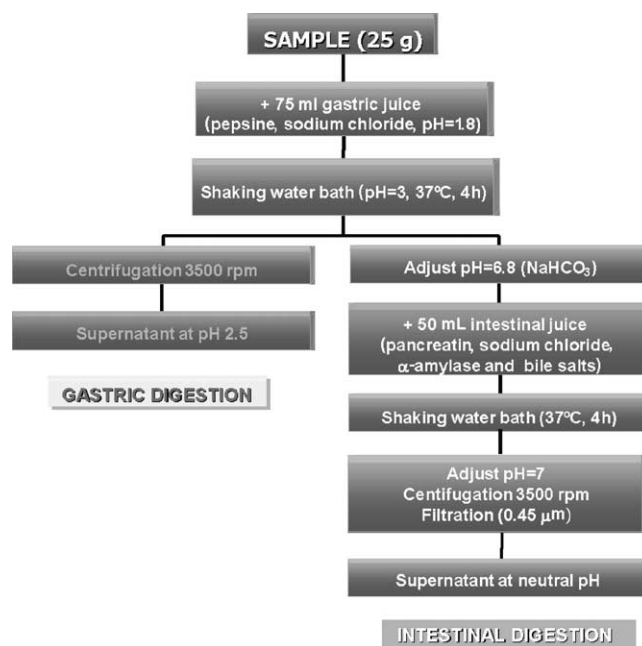


Fig. 1. Flow chart of the experimental protocol of the enzymolysis approach.

### 2.4. Procedures

#### 2.4.1. In vitro gastrointestinal digestion method

The in vitro digestion method used was based on that described by Lutén et al. [20], modified and adapted for the fish being studied (Fig. 1). About 25 g of sample were placed in a 250 mL Erlenmeyer flask with 75 mL of gastric juice (6%, w/v pepsin in 0.15 M NaCl, acidified with HCl to pH 1.8) and shaken for 1 min for initial degassing. The mixtures were then held in a thermostatic water bath for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , shaking periodically. After 1 h the pH was checked and adjusted to 3 with 6 M hydrochloric acid.

After gastric digestion, saturated sodium bicarbonate was added to raise the pH to 6.8. Then 50 mL of intestinal juice (1.5%, w/v pancreatin, 0.5%, w/v amylase and 0.15%, w/v bile salts, in 0.15 M NaCl) were added and the mixture was energetically shaken for 1 min and left in a thermostatic water bath for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , shaking periodically. Once gastric/gastrointestinal digestion was completed, a 10 mL aliquot of the suspension was transferred to a polypropylene tube and centrifuged at  $1575 \times g$  for 1 h. The supernatant was filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  Millipore filter, to reduce any effect from microbial activity and both supernatants and precipitates were stored in the dark at  $4^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Gastric and intestinal digestion blanks were obtained by adding 75 mL of gastric juice to 25 mL of Milli-Q water and 50 mL of intestinal juice respectively, and the above procedure was applied. In addition some blanks were spiked prior to enzymolysis with SeMet and MeHg to determine the recovery of the added Se and Hg at the end of the gastric and gastrointestinal stages.

The soluble Se and Hg contents ( $\mu\text{g g}^{-1}$  fish) constitute the bioaccessible fraction. The bioaccessibility of these contents for fish is defined as the proportion of Se or Hg in fish available for absorption and it was calculated as

Bioaccessibility

$$= \frac{[\text{Se or Hg in bioaccessible fraction}]}{[\text{Se or Hg in fish}]} \times 100$$

#### 2.4.2. Total selenium quantification

Fish tissues (0.5 g of wet fish or 0.2 g of dry fish) were digested with 2 mL of nitric acid and 0.5 mL of hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 43% power output. The pressure was held at 20 psi for 15 min, at 40 psi for 30 min and finally at 85 psi for 1 h.

Se(VI) was reduced to Se(IV) by adding concentrated hydrochloric acid (6 M final concentration) to the digest and heating at 95 °C for 1 h. The solutions were then diluted to 25 mL with Milli-Q water.

Total selenium concentration was determined by the continuous selenium hydride system connected to AFS equipment. A flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup> (3 M hydrochloric acid) and a similar flow rate of the reductant solution (1%, w/v sodium tetrahydroborate) were used to generate the selenium hydride.

#### 2.4.3. Selenium speciation

*Aqueous leaching.* 3 mL of Milli-Q water were added to approximately 200 mg of sample and sonicated for 30 min. Next the solution was centrifuged at 14,000 × g for 15 min. The supernatant and the solid residue were enzymatically hydrolyzed separately, to extract seleno-amino acids incorporated into proteins, as described below.

*Enzymatic hydrolysis.* Fish samples were enzymatically hydrolyzed following a previously developed method [11] (hydrolysis of water-soluble fraction and its solid residue at pH 7.5), but using a non-specific protease (*S. griseus*, Pronase E) instead of Subtilisin.

*Ultrafiltration.* In order to enhance the clean-up procedure, the supernatants were processed through a 10 kDa cut-off filter. Finally, the filtrates were diluted to 10 mL with Milli-Q water.

For selenium speciation, the ultrafiltered samples were injected into the chromatographic system.

*Quantification.* Selenium species were quantified by LC-ICP-MS using the operating conditions given in Table 1. For this purpose a cationic exchange column using 4 mM pyridine at pH 2.8 and 4.7 as a mobile phase was used. The analytical peaks were evaluated in terms of peak area by the standard addition method at  $m/z$  82 and 78.

#### 2.4.4. Total mercury quantification

The acid digestion procedure used for mercury quantification was the same as that described for total selenium quantification.

Table 1

Instrument operating conditions for Se determination by LC-ICP-MS

LC parameters	
Analytical column	PRPX-200
Eluent	4 mM pyridine formate solution, H <sub>2</sub> O:MeOH (97:3)
Eluent flow rate	1 mL min <sup>-1</sup>
Elution programme	Isocratic
Injection volume	100 $\mu\text{L}$
ICP-MS conditions	
Forward power	1260 W
Plasma gas (Ar) flow rate	15 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas (Ar) flow rate	1.3 L min <sup>-1</sup>
Carrier gas (Ar) flow rate	1.1 L min <sup>-1</sup>
Nebulizer type	Babington

Total mercury concentration was determined by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by the continuous mercury cold vapour system connected to AFS equipment. A flow rate of 2.5 mL min<sup>-1</sup> (3 M HCl) and a similar flow rate of the reductant solution (3% SnCl<sub>2</sub> in 15% HCl) were used to generate the mercury cold vapour.

#### 2.4.5. Mercury speciation

Mercury species leaching was performed following an acid leaching procedure developed previously [21].

*Acid leaching.* A 300 mg portion of samples and 5 mL of 5 M hydrochloric acid were placed in a borosilicate glass tube and sonicated for 5 min.

*Mercury speciation.* After neutralization of the HCl extract, mercury species were converted into their bromide derivatives (RHgBr).

Organomercury species were extracted into an organic phase by adding 5 mL of methylene chloride and shaking the mixture for 5 h. The samples were then centrifuged for 10 min. A 4 mL aliquot of the organic solvent layer containing the extracted organomercury was transferred to a glass vial, and 1 mL of 0.01 M sodium thiosulphate solution was added. The solution was mixed for 20 min and subsequently centrifuged at 1575 × g.

The aqueous layer (800  $\mu\text{L}$ ) was placed in a 3 mL polyethylene vial and 300  $\mu\text{L}$  of KBr/CuSO<sub>4</sub> and 300  $\mu\text{L}$  of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added. Each vial was manually shaken for 1 min, centrifuged and 0.1–0.2 mL of the organic extract was placed in a 2 mL borosilicate glass vial.

*Detection.* Organic mercury speciation was performed with the coupling GC-pyrolyzer-AFS.

Helium with a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup> was used as the carrier gas. The temperatures were 250 °C for the injector and 40 °C with a ramp of 15 °C min<sup>-1</sup> up to 200 °C for the oven.

For AFS detection, argon was used as make-up gas and sheath gas at flows of 60 and 300 mL min<sup>-1</sup>, respectively.

*Total organomercury determination.* After acid leaching the total organomercury content in the supernatants was determined by difference between total mercury content (after

digestion with  $\text{HNO}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and inorganic mercury content, by using stannous chloride as a selective reductant.

### 2.5. Validation of the results

In the present work, two certified reference materials were employed for validation of the methodologies used. Method validation for mercury was performed by using the reference material CRM-463, certified for methylmercury ( $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ ), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR), while for total selenium a marine tissue reference material (Murst-ISS A2), certified for total selenium ( $7.37 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$ ) was used.

### 2.6. Statistical analysis

A one-factor analysis of variance was applied to detect possible differences in total, organic, bioaccessible selenium and mercury content and in bioaccessibility between the three studied fish. A significance level of  $P < 0.05$  was adopted for all comparisons. Statgraphics Plus version 4.0 (Statistical Graphics) was used for the statistical analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Total and Se speciation in fish samples

Table 2 shows the total Se and SeMet concentrations in uncooked (tuna, swordfish and sardine) and cooked fish (tuna). Total selenium concentration in uncooked fish tissue varied between  $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$  (swordfish) and  $0.51 \mu\text{g g}^{-1}$  (tuna). The value for Se in these three fish species was comparable with other Se data for fish [22–24] and agrees with the finding that selenium content in the edible part of fish products varies within a rather small range from 0.2–0.9 mg  $\text{kg}^{-1}$  (Food Standards Agency).

For tuna, cooking did not produce a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in the total selenium concentration, as has been reported previously by other authors [25].

According to the data reported here, fish is a good source of selenium and could substantially contribute to meeting the Se requirements for adult humans presented by the World Health Organization (WHO, 1996) (0.39 and 0.42  $\mu\text{g kg}^{-1}$  body weight for adult men and women, respectively) [26].

Since selenium bioaccessibility is influenced by the chemical form of Se, before any conclusions can be drawn about the bioaccessibility of selenium from fish, the chemical species of Se present must be known.

After the aqueous leaching, it was found that the percentage of soluble selenium was between 3 and 10% of the total concentration, the rest being found in the solid fraction.

For selenium speciation in both, the water-soluble fraction and the solid residue, two-step enzymatic hydrolysis followed by ultrafiltration with 10 kDa cut-off filters was attempted. For swordfish, selenium recoveries ranged from 91 to 95%, which indicates that the molecular weight of most of the selenium species extracted during the hydrolysis was lower than 10 kDa. When tuna and sardine were analyzed, the recovery ranged from 45 to 65%, respectively, which means that the hydrolysis was not as effective in breaking down the peptides or proteins into smaller fractions as it was for swordfish, so some selenium may have remained in peptide form. This explanation stems from the knowledge that in the enzymatic hydrolysis of proteins, some peptide bonds can remain intact depending on the cleavage specificity of the enzyme [8]. This could be the reason why a selenium fraction with a molecular weight higher than 10 kDa remained after the enzymatic hydrolysis step. In this study, five standard Se compounds were tested for Se separation in a cationic exchange column at two pH values (2.8 and 4.7) (Fig. 2).

A chromatographic analysis was performed on three different fish samples. Fig. 3 shows the chromatograms obtained for these samples (solid residue). Two peaks can be distinguished in each of the sample evaluated. The first peak was unidentified; it could not be attributed to any of the selenium species tested, so it could correspond to any anionic selenium species that elutes in the dead volume. The second peak was identified as SeMet, the only seleno-amino acid found in both extracts. The identification of the peaks was carried out by the spiking procedure. The chromatographic profiles obtained by the two chromatographic methods used (at pH 2.8 and 4.7) were the same in both the water-soluble fraction and the solid residue.

The total amount of SeMet varied depending on the type of fish. In swordfish, 85% of the total Se was found to be SeMet, whereas tuna and sardine had lower percentages of SeMet (45 and 25%, respectively). The value for SeMet for these species was comparable with other SeMet contents found in marine tissues (e.g. oyster, 47% [11]).

Table 2  
Total selenium and SeMet concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) found in fish samples by HG-AFS and HPLC-ICP-MS after an enzymatic hydrolysis procedure

Sample	Moisture ( $n = 5$ ) (%)	Total Se fresh fish ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total Se dry fish ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total SeMet ( $n = 5$ ) (water-soluble fraction + solid residue) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Tuna	68	$0.51 \pm 0.02$	$1.57 \pm 0.06$	$0.70 \pm 0.04$
Cooked tuna	43	$0.50 \pm 0.02$	$0.87 \pm 0.02$	$0.37 \pm 0.03$
Swordfish	78	$0.25 \pm 0.02$	$1.13 \pm 0.04$	$0.96 \pm 0.04$
Sardine	76	$0.38 \pm 0.02$	$1.58 \pm 0.02$	$0.40 \pm 0.03$
Murst-ISS A2 <sup>a</sup>	2	–	$7.42 \pm 0.52$	–

<sup>a</sup> Certified value:  $7.37 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$ .

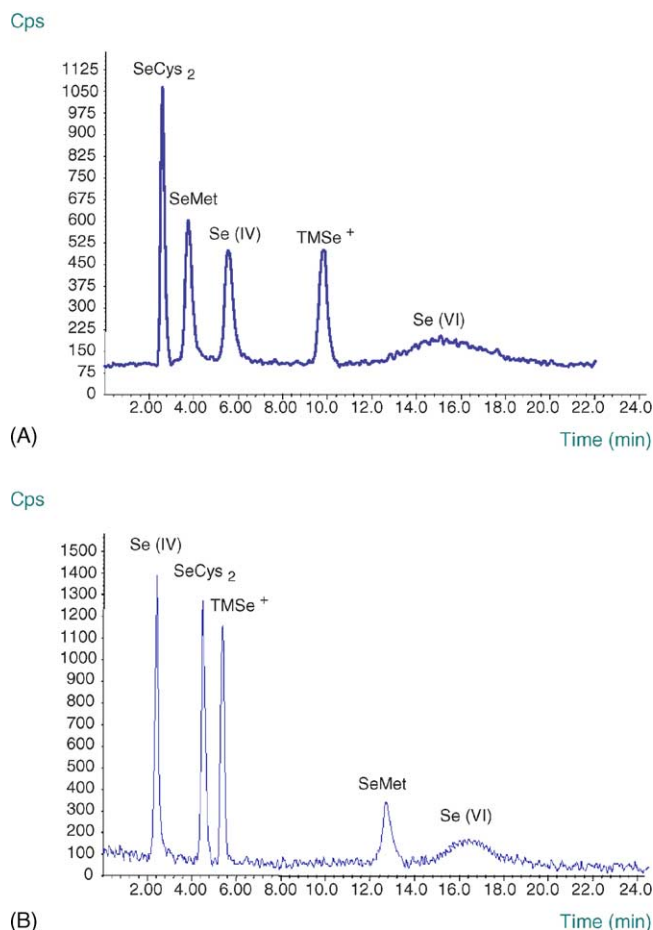


Fig. 2. Chromatograms of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of Se species obtained for cationic exchange chromatography at two pH values: (A) 4.7 and (B) 2.8.

The quality assurance procedures for these analyses included the measurement of a marine tissue reference material (Murst-ISS A2). Since, at the 95% confidence level, no significant differences were detected between the certified value and the experimental one, the method used was considered accurate for total selenium determination.

### 3.2. Bioaccessibility of Se in fish

Table 3 shows total Se contents recovered from the simulated gastric and intestinal digestion of fish. The simulated gastrointestinal digestion residue was also analyzed.

Table 3  
Bioaccessible Se contents in dry and cooked fish

Sample	Bioaccessible Se		Residue ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
	Gastric digestion ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Gastrointestinal digestion ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
Tuna	$761 \pm 23$	$763 \pm 15$	$769 \pm 33$
Cooked tuna	$406 \pm 8$	$477 \pm 5$	$347 \pm 20$
Swordfish	$525 \pm 5$	$840 \pm 25$	$214 \pm 8$
Sardine	$1107 \pm 33$	$1331 \pm 27$	$201 \pm 7$

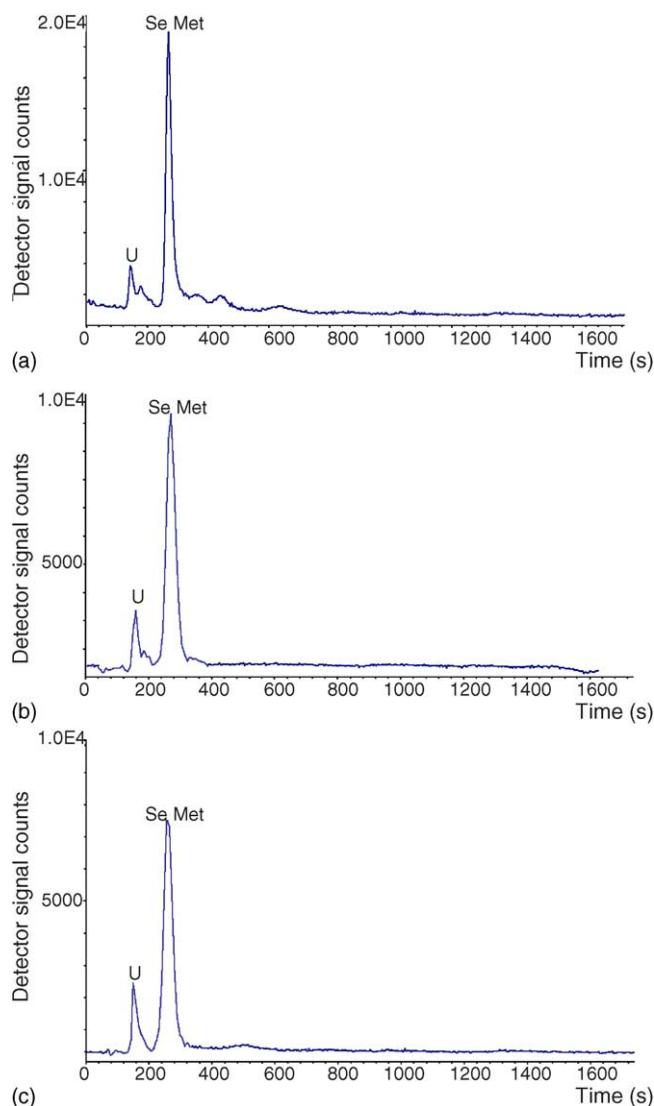


Fig. 3. Chromatograms of Se species found after enzymatic hydrolysis in the solid residue of: (A) swordfish, (B) tuna and (C) sardine. U: unidentified Se species. Cationic exchange chromatography at pH 4.7.

The recoveries of endogenous Se from uncooked fish in the gastric (pH 2.0) and gastrointestinal (pH 6.8) supernatants varied depending on the type of fish studied. Between 47 and 70% of the selenium in fish were bioaccessible in the simulated stomach digestion, whereas at the neutral pH of intestinal juice, the bioaccessible fractions of selenium were between 50 and 83%. The low bioaccessible values found in some fish may reflect either insoluble Se bound to the residue or an equilibrium between the solid and liquid phases.

For tuna, the solubility of selenium after gastric digestion did not differ significantly from that after gastric plus intestinal digestion. Unlike tuna, the Se solubility in the gastrointestinal supernatants of sardine and swordfish was 17 and 60% higher than in the gastric digestion step.

Selenium contents of the supernatant intestinal juice are assumed to be a measure of the bioaccessible fraction, as a result of both stomach and intestinal digestion. The Se



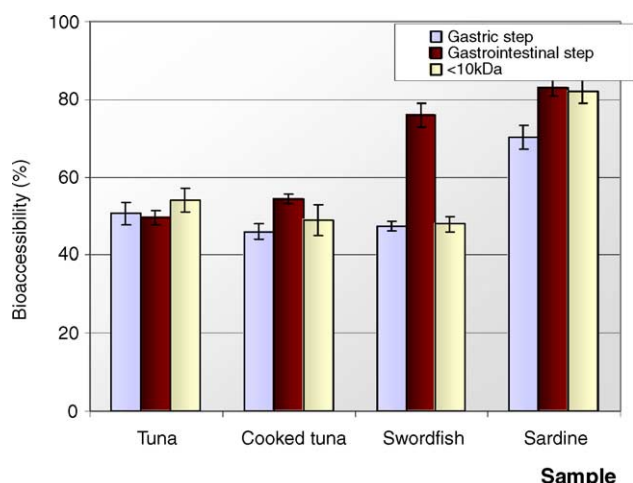


Fig. 4. Gastric and gastrointestinal Se bioaccessibility in fish.

content in the bioaccessible fraction varied between 480 and 1300  $\mu\text{g g}^{-1}$ , with significant differences ( $P < 0.05$ ) between the different types of fish, showing the following gradation: sardine > swordfish > tuna.

When the results are expressed as percentages, i.e., as bioaccessibility (Fig. 4) it can be seen that the bioaccessibility of Se in swordfish and sardine was higher (76 and 83%, respectively) than in tuna (50%). This might be due to differences in the composition of the fish, since proteins and fat content may affect the solubility of Se, or to a different capability of the enzymes in the in vitro method for releasing the Se existing in each sample.

The gastric digestion procedure used (pepsin/HCl) in this study mainly breaks proteins down into lower molecular weight peptides through the action of proteinases and peptidases. The intestinal digestion procedure through the use of pancreatin (a mixture containing mainly lipase and protease) cleaves carbohydrates into monosaccharides and proteins into peptides. Finally, bile salts facilitate digestion of fats due to their emulsion forming properties [27].

The percentages of ultrafilterable (<10 kDa) selenium (Fig. 4) following simulated gastrointestinal digestion of tuna and sardine showed no decrease in the bioaccessible fraction. Therefore, no significant differences were found between this value and the one provided above. On the contrary, for swordfish, the ultrafilterable Se was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than the Se existing in the bioaccessible fraction filtered with a 0.45  $\mu\text{m}$  filter, which means that the in vitro digestion was not as effective in breaking down the peptides or proteins in smaller fractions as it was for tuna or sardine, so some selenium may have remained in peptidic form. This may be why a selenium fraction with a molecular weight higher than 10 kDa remained after the in vitro gastrointestinal digestion.

The recoveries obtained from gastric and intestinal digestion for Se are in good agreement with those found in the literature (e.g., cod: 61% [23], mussel: 84% [20], shrimp: 70% [28]).

The value for Se in the cooked tuna was slightly higher ( $P < 0.05$ ) than in uncooked tuna. In most cases, fishery products are processed prior to consumption. Processing might affect the efficiency with which the digestive enzymes release Se. During thermal processing, the application of heat hastened loss of water and vitamins, and protein degradation. Chemical contaminants may also be affected by the heat applied. Shen et al. [14] reported that after ripening process, not only the protein pattern and Se distribution from herring changed, but the availability of Se was also increased, which is supposed to be due to protein degradation during the ripening process. The protein degradation can improve protein digestibility, which will facilitate the release of bound Se and therefore increase Se bioaccessibility. Choosing the right way to process fishery products could improve their nutritive value.

In the three samples, a mass balance was performed after application of the in vitro digestion method. Both the soluble fraction and non-soluble fraction resulting from application of the in vitro digestion method were analyzed. The mass balance results for Se were as follows: tuna =  $105 \pm 8\%$ , sardine =  $92 \pm 6\%$  and swordfish =  $97 \pm 8\%$ .

### 3.3. Se speciation of the gastrointestinal extracts

When studying bioaccessibility, one should not rule out the possibility that the in vitro digestion method employed may bring about some transformation of the selenium species present in the initial product. In order to evaluate this, selenium speciation of the gastrointestinal extracts of fish was carried out.

Furthermore, in order to find out whether cooking made a significant difference to selenium assimilation potential by humans, both dry and cooked tuna were analyzed. LC-ICP-MS was used to study the possible changes in Se species during cooking and simulated gastrointestinal digestion of fish.

A chromatographic analysis was performed on gastric and gastrointestinal extracts ultrafiltered with 10 kDa cut-off filters. Fig. 5 shows the chromatograms obtained for these samples. SeMet was found to be the dominant Se species in tuna samples, being the only seleno-amino acid found in both extracts. The first peak was unidentified; it could not be attributed to any of the selenium species tested, so it could correspond to any anionic selenium species that elutes in the dead volume. The swordfish and sardine extracts showed a second unidentified peak, whereas the third one was identified as SeMet. The identification of the peaks was carried out by the spiking procedure. The chromatographic profiles obtained by the two chromatographic methods used (at pH 2.8 and 4.7) were the same.

In addition, similar chromatograms were obtained for both cooked and uncooked tuna, which shows that cooking did not modify the seleno-amino acid SeMet content.

To ensure that no selenium compounds lower than 10 kDa were retained in the filters, we determined the total selenium

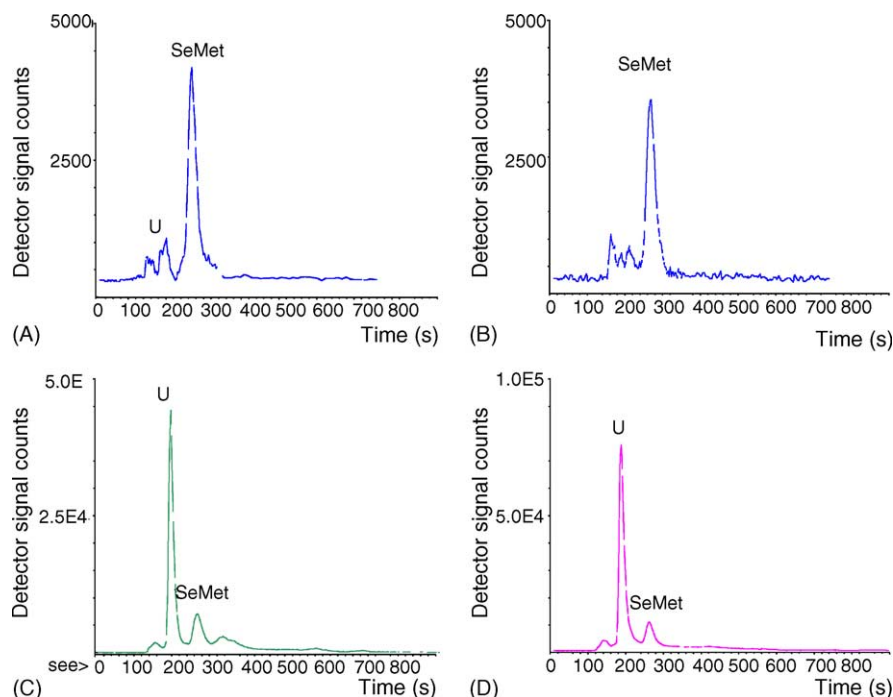


Fig. 5. Chromatograms of Se species found after *in vitro* gastrointestinal digestion of: (A) tuna, (B) cooked tuna, (C) swordfish and (D) sardine. U: unidentified Se species. Cationic exchange chromatography at pH 4.7.

content in the extracts (spiked with the standards) after filtration. The result, an average recovery of 95–105% of total selenium, showed that selenium losses did not occur with this sample treatment.

In order to identify the unknown peaks, possible SeMet modification during digestion was also evaluated. The recovery of Se, as SeMet, added to a digestion blank and to a tuna sample before the start of *in vitro* enzymolysis was  $102 \pm 7$  and  $97 \pm 6\%$ , respectively. This was accepted as satisfactory. SeMet was found in these cases, with no signs of modification as predicted by the literature [29].

The results of speciation analysis of the gastrointestinal digestion extracts show that the amount of SeMet varied depending on the type of fish. Tuna and sardine had a higher bioaccessible SeMet concentration ( $0.290 \pm 0.006$  and  $0.245 \pm 0.006 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively) than swordfish ( $0.147 \pm 0.005 \mu\text{g g}^{-1}$ ). However, tuna, swordfish and sardine had similar percentages of bioaccessible SeMet (19, 14 and 16%, respectively) relative to the total Se content.

Unlike what happened when Se speciation was performed on fish samples using Pronase, *i.e.* SeMet content varied within the fish species, *in vitro* digestion resulted in the same percentage of bioaccessible SeMet regardless of the sample analyzed, although selenium bioaccessibility varied depending on the fish species. Therefore, bioaccessible SeMet may be located in proteins of similar nature and accessibility.

By contrast, the SeMet percentage found in uncooked and cooked tuna remained unalterable.

According to the literature, SeMet is the main form of Se found in food [7,30,31]. This means that most Se in plant and

animal material consumed by humans will be in the form of SeMet [32]. In addition, various studies have shown that selenomethionine is absorbed and retained more efficiently than selenate [8–10,33], maintaining higher post-supplementation levels [8]. Also, various animal studies found that Se supplemented as fish was more highly retained than when is supplemented as sodium selenite [33,34].

#### 3.4. Total and Hg speciation in fish samples

Table 4 shows total Hg contents in muscle of various species of uncooked and cooked fish. In uncooked fish, the Hg content varied between  $0.072$  and  $0.43 \mu\text{g g}^{-1}$ , with significant differences ( $P < 0.05$ ) in concentration depending on the type of fish analyzed (swordfish > tuna  $\gg$  sardine). The value for mercury in these three species was comparable with other Hg data for fish [22,35,36]. Such variability is in accordance with the cumulative process of mercury uptake in fish and the interaction of biotic parameters such as age, size, sex, metabolism and feeding habits [37–39].

All these values are in compliance with European Commission Regulations 466/2001 and 221/2002 [40,41], which form part of EC food hygiene legislation, and set the maximum limit for mercury in whole fresh fish at  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , except for mainly predatory species, which may have a higher mercury concentration ( $1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Even though swordfish, sardine and tuna had similar Se contents, the molar ratio Se:Hg varied from 1.5 (swordfish) to 13 (sardine). As a consequence, sardine seems to be prefer-

Table 4  
Total mercury concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) found in fish samples by CV-AFS

Sample	Moisture ( $n = 5$ ) (%)	Total Hg fresh fish ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Total Hg dry fish ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	MeHg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Tuna	68	$0.43 \pm 0.02$	$1.34 \pm 0.06$	$1.27 \pm 0.07$
Cooked tuna	43	$0.42 \pm 0.02$	$0.98 \pm 0.01$	–
Swordfish	78	$0.42 \pm 0.01$	$1.91 \pm 0.04$	$1.85 \pm 0.08$
Sardine	76	$0.072 \pm 0.002$	$0.30 \pm 0.01$	$0.28 \pm 0.03$
CRM-463 <sup>a</sup>	3	–	$2.87 \pm 0.07$	–

<sup>a</sup> Certified value:  $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ .

able, due to its low mercury content and considerable selenium content.

Since the toxic effect of mercury depends not only on its total concentration, but also on its species, mercury speciation was performed. Mercury species extraction was conducted following acid leaching (hydrochloric acid) combined with ultrasound bath extraction [21].

Once total mercury extraction had been completed, organic and inorganic mercury were determined in the acid extract. The results showed that organomercury compounds comprised more than 92% of the total mercury in fish samples.

In order to evaluate the organomercury compounds, the HCl leaching procedure was performed and then, mercury speciation of the extracts with gas chromatography coupled to pyrolysis with atomic fluorescence detection was carried out.

Chromatographic analysis was performed on different fish samples, but only MeHg was detected. This is in good agreement with the literature, since MeHg is the only organomercury compound found in fish [42].

The amount of mercury found depends on the fish, but the percentage of MeHg (Table 4) in all samples is higher than 94%. No significant differences were found between this value and the one given above for total organomercury compounds.

The method was validated using the CRM-463 tuna fish. No significant differences were found between the certified value and the one provided by the acid leaching method (GC-AFS) at the 95% confidence level.

### 3.5. Bioaccessibility of Hg in fish

Table 5 shows total Hg contents recovered from the simulated gastric and intestinal digestion of fish.

Table 5  
Bioaccessible Hg contents in fish

Sample	Bioaccessible Hg		Residue ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
	Gastric digestion ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Gastrointestinal digestion ( $n = 5$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
Tuna	$264 \pm 12$	$106 \pm 11$	$1152 \pm 81$
Swordfish	$207 \pm 7$	$317 \pm 20$	$1602 \pm 77$
Sardine	$26 \pm 2$	$38 \pm 5$	$251 \pm 10$

The simulated gastrointestinal digestion residue was also analyzed.

The recoveries of endogenous Hg from uncooked fish in the gastric (pH 2.0) and gastrointestinal (pH 6.8) supernatants varied depending on the type of fish (Fig. 6). This might be due to differences in the composition of the fish, which might affect the solubility of Hg, or Hg release in each sample. Between 9 and 20% of the mercury in fish was bioaccessible in the simulated stomach digestion, whereas at the neutral pH of intestinal juice, the bioaccessible fractions of mercury were between 9 and 17%. These results are conflict with earlier experiments on animals under MeHg administration, in which the high absorption, and therefore bioavailability of MeHg, is addressed. The low Hg recovery obtained in this study could be attributed to the low ability of enzymes in the in vitro method to release the Hg existing in each of the samples, perhaps due to the matrix or to poor access of the enzyme to the substrate, rather than to a lack of bioaccessibility of the MeHg itself. In fact, a recovery of 89% was obtained from in vitro enzymolysis of MeHg.

The solubility of mercury after gastric digestion differed significantly ( $P < 0.05$ ) from that after gastrointestinal diges-

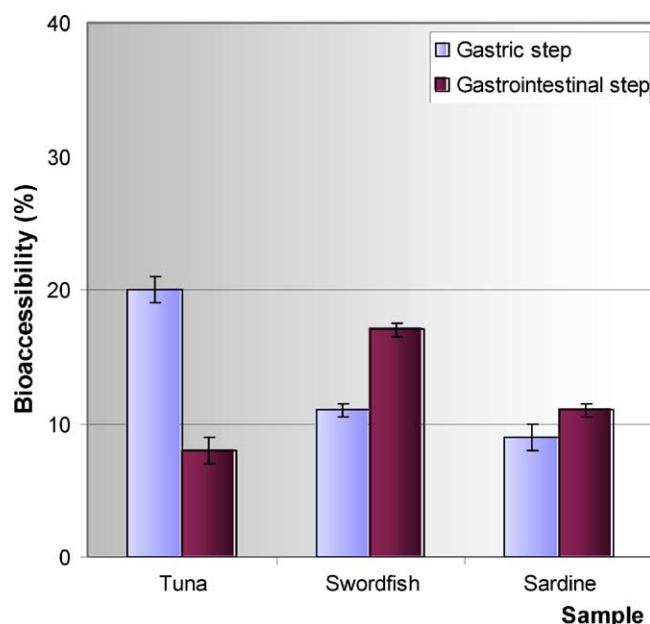


Fig. 6. Gastric and gastrointestinal Hg bioaccessibility in fish.

tion for tuna, swordfish and sardine, where the Hg solubility in the gastrointestinal supernatants were 40% lower and 54 and 22% higher, respectively, than in the gastric digestion step.

The mercury content of the supernatant intestinal juice is assumed to be a measure of the mercury available for absorption, as a result of both stomach and intestinal digestion. The total Hg content in the bioaccessible fraction varied among the different types of fish, in the following order: swordfish > sardine > tuna. Thus swordfish had the highest bioaccessibility. The very low bioaccessible Hg content in sardine is a further reminder of the benefit from this product compared with the two other fish.

A mass balance was performed on the three samples after application of the *in vitro* digestion method. The soluble fraction and precipitate resulting from application of the *in vitro* digestion method were analyzed. The results of mass balance for Hg were as follows: tuna =  $97 \pm 9\%$ , sardine =  $91 \pm 8\%$  and swordfish =  $110 \pm 7\%$ .

### 3.6. Hg speciation of the gastrointestinal extracts

In order to evaluate possible transformation of mercury species, mainly MeHg, present in the initial product, following the gastrointestinal procedure, the extracts were directly analyzed by selective reduction with 3% (w/v) stannous chloride and measurement by CV-AFS. Total mercury was determined by the same procedure but with previous  $\text{HNO}_3\text{--H}_2\text{O}_2$  digestion of the extract. Organic mercury was calculated as the difference between the values obtained in the two steps. The results obtained showed that the bioaccessible mercury was not transformed into inorganic forms, so it remained as organomercury after *in vitro* gastrointestinal digestion.

### 3.7. Bioaccessible selenium–mercury ratios

One of our goals in this work was to contribute to assessing the risk represented by toxic metals through the determination of bioaccessible mercury and selenium content, their speciation in fish and the determination of the Se:Hg,  $[\text{Se}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  and  $[\text{SeMet}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  ratios.

Even though tuna and sardine had similar Se contents, the Se:Hg molar ratio varies from 1.5 (tuna) to 13 (sardine). As a consequence, taking into account its total Se and Hg content, sardine is the preferred fish species, due to its low mercury content and considerable selenium content.

The same behavior was observed (Fig. 7) when simulating *in vitro* gastrointestinal digestion. The  $[\text{Se}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  ratios varied to the same extent as they did above, showing the following order: sardine > tuna > swordfish (96, 19 and 7, respectively).

Furthermore, although the highest  $\text{SeMet}_{\text{bioaccessible}}$  content was found in tuna, the highest values of  $[\text{SeMet}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  ratio (20) and  $[\text{Se}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  ratio were in sardine, and the lowest value in swordfish (2.4).

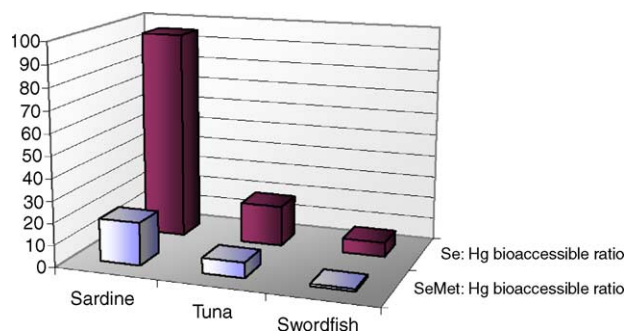


Fig. 7. Molar  $\text{Se}:\text{Hg}_{\text{bioaccessible}}$  and  $\text{SeMet}:\text{Hg}_{\text{bioaccessible}}$  ratios found in fish samples after an *in vitro* gastrointestinal digestion.

Therefore sardine consumption would be preferable to tuna and swordfish.

## 4. Conclusions

Selenium and mercury bioaccessibility was found to be dependent on the type of fish analyzed due to different degradation effectiveness of the food matrix and consequent release of these elements.

Simulated human gastric and intestinal digestion led to a high selenium bioaccessibility and the identification of SeMet in the three fish studied. Furthermore, this selenium compound was not modified during digestion.

Regardless of the sample, it was found that bioaccessible SeMet accounted for the same percentage of the total Se. Therefore, bioaccessible SeMet may be located in proteins of similar accessibility in all the samples. In addition, cooking did not modify the SeMet found in the sample.

By contrast, low Hg bioaccessibility and no modification during digestion was found for all samples.

The molar ratios Se:Hg,  $[\text{Se}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  and  $[\text{SeMet}:\text{Hg}]_{\text{bioaccessible}}$  showed the same order: sardine > tuna > swordfish. In conclusion, the most favorable fish for human consumption can be predicted by calculating the molar ratio Se:Hg.

## Acknowledgements

One of the authors (A. Cabañero) wishes to thank the Complutense University for support through a predoctoral fellowship.

## References

- [1] G.E. Duke, A.A. Jegers, G. Loff, O.A. Evanson, *Biochem. Physiol.* 50A (1975) 649.
- [2] G. Tao, S.N. Willie, R.E. Sturgeon, *Analyst* 123 (1998) 1215.
- [3] World Health Organization, Methylmercury, Environmental Health Criteria, WHO, Geneva, 1990, 101 pp.
- [4] G.M. Egeland, J.P. Middaugh, *Science* 278 (1997) 1904.

- [5] L. Ebdon, L. Pitts, R. Cornelis, H. Crews, O.F.X. Donard, P. Quevallier, in: RSC (Eds.), *Trace Element Speciation for Environment and Health*, Cambridge, UK, 2001.
- [6] G.F. Combs, S.B. Combs, *The Role of Selenium in Nutrition*, Academic Press, New York, 1986.
- [7] M. Yoshida, M. Abe, K. Fukunaga, K. Kikuchi, *Food Additives and Contaminants* 19 (2002) 990.
- [8] L.A. Dannielis, *Biological Trace Element Research* 54 (1996) 185.
- [9] S.J. Fairweather-Tait, *Eur. J. Clin. Nutr.* 51 (1997) 20.
- [10] J. Ortuño, G. Ros, M.J. Periago, C. Martínez, G. López, *Food Sci. Technol. Int.* 2 (1996) 135.
- [11] P. Moreno, M.A. Quijano, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara, *J. Anal. Atomic Spectrom.* 16 (2001) 1044.
- [12] A. Asean, M. Vasconcelos, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 899.
- [13] P. Hocquellet, M. L'hotellier, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 920.
- [14] L.H. Shen, N.M. Hook-van, J.B. Luten, *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*, 1997, p. 653.
- [15] D. Miller, B. Schricker, R. Rasmussen, D. Van Campen, *Am. J. Clin. Nutr.* 34 (1981) 2248.
- [16] L.G. Danielsson, A. Zarpén, A.W. Glynn, *Analyst* 120 (1995) 713.
- [17] S. Boise, B.O. Eggum, *Nutr. Res. Rev.* 4 (1999) 141.
- [18] M.V. Ruby, R. Schoof, W. Brattin, M. Goldade, G. Posst, M. Harnois, D.E. Mosbe, S.W. Casteel, W. Berti, M. Carpenter, D. Edwards, D. Cragin, W. Chappell, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3697.
- [19] I.S. Palmer, D.D. Fisher, A.W. Halverson, O.E. Olson, *Biochem. Biophys. Acta* 177 (1969) 336.
- [20] J.B. Luten, W. Bouquet, M. Burggraaf, J. Rus, in: P. Bratter, P. Schramel (Eds.), *Trace Elements: Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Galter de Gruter, New York, 1987, p. 509.
- [21] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Anal. Atomic Spectrom.* 17 (2002) 1595.
- [22] M. Plessi, D. Bertelli, A. Monzani, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 461.
- [23] H.M. Crews, P.A. Clarke, D.J. Lewis, L.M. Owen, P.R. Strutt, *J. Anal. Atomic Spectrom.* 11 (1996) 1177.
- [24] M. Yoshida, M. Abe, K. Fukunaga, K. Kikuchi, *Food Addit. Contam.* 10 (2002) 990.
- [25] D.J. Higgs, V.C. Morris, O.A. Levander, *J. Agric. Food Chem.* 20 (1972) 678.
- [26] World Health Organization, *Trace Elements in Human Nutrition and Health*, WHO, Geneva, 1996, p. 105.
- [27] M.S. Vázquez, A.M. Gutiérrez, M.M. Gómez, M.A. Palacios, *Quím. Anal.* 13 (1994) 144.
- [28] S. Hassan, J. Hakkarainen, P.J. Lindberg, *Vet. Med.* 34 (1987) 353.
- [29] O.A. Levander, in: W. Mertz (Ed.), *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Academic Press, New York, 1989, p. 209.
- [30] G.N. Schrauzwer, *J. Nutr.* 130 (2000) 1653.
- [31] G.N. Schrauzwer, *Adv. Food Nutr. Res.* 47 (2003) 73.
- [32] R.A. Sunde, in: B.L. O'Dell, R.A. Sunde (Eds.), *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*, Marcel Dekker, New York, 1997, p. 493.
- [33] R. Ornsrud, M. Lorentzen, *Br. J. Nutr.* 87 (2002) 13.
- [34] H.Y. Wen, R.L. Davis, B. Shi, J. Chen, M. Boylan, J.E. Spallholz, *Biol. Trace Element Res.* 58 (1997) 43.
- [35] C.R. Joiris, L. Holsbeek, N.L. Moatemri, *Mar. Pollut. Bull.* 38 (1999) 188.
- [36] A.V. Holden, *J. Food Technol.* 8 (1973) 1.
- [37] P. Lansens, M. Leermarkers, W. Baeyens, *Water Air Soil Pollut.* 56 (1991) 103.
- [38] T.M. Grieb, C.T. Briscoll, S.P. Gloss, C.L. Schofield, G.L. Bowie, D.B. Pordello, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 919.
- [39] N.S. Bloom, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 (1992) 1010.
- [40] Commission Regulation (EC) No. 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2001.
- [41] Commission Regulation (EC) No. 221/2002 of 6 February 2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2002.
- [42] Y. Cai, J.M.J. Bayona, *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 113.

**ACUMULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE  
MERCURIO EN AVES. EFECTO PROTECTOR DEL SELENIO**

Capítulo VII

## **CAPITULO VII: ACUMULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE MERCURIO EN AVES. EFECTO PROTECTOR DEL SELENIO.**

---

**1. EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO DE PIENSOS CON SELENIO Y ARCILLAS EN LA BIOACUMULACIÓN DE MERCURIO**

**2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE SELENIO Y SU INTERACCION CON Hg MEDIANTE EL USO DE CV-AFS, ICP-MS Y HPLC-ICP-MS.**

**3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN MERCURIO-SELENIO EN HÍGADO DE POLLO MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR ACOPLADA AL ICP-MS**

---

Actualmente la mayoría de la población está expuesta principalmente al mercurio a través de la dieta (pescados). Su carácter lipofílico facilita su absorción en los tejidos grasos y por tanto su bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria, hecho que explica las elevadas concentraciones de este compuesto en alimentos expuestos a bajos niveles de mercurio.

Recientemente, la incorporación de ciertos productos derivados de la pesca, como las harinas de pescado, en piensos de alimentación animal ha supuesto un aumento de la presencia de mercurio en productos de consumo animal. Como consecuencia, la carne procedente de animales alimentados con estos productos podría favorecer la exposición del hombre al mercurio.

Por ello, el objetivo principal de este capítulo es contribuir a la evaluación del riesgo asociado a la exposición de aves a mercurio inorgánico y orgánico. Además de la incorporación de agentes adsorbentes no nutritivos (arcillas) o antagonico (Se) para poder reducir así la absorción gastrointestinal de este metal pesado, y consecuentemente sus efectos tóxicos. También, se intenta clarificar los posibles mecanismos de interacción entre ellos.

Los resultados obtenidos se recogen en las tres publicaciones que se presentan a continuación.

En el primer trabajo (sección 1) **“Effect of animal feed enriched with Se and clays on Hg bioaccumulation in chickens: in vivo experimental study”** (J. Agricultural and Food Chemistry, 2005, ) se recogen los resultados y conclusiones derivadas de los estudios realizados sobre el efecto que ejerce la suplementación de materiales adsorbentes y antagonicos a través de la dieta en la bioacumulación del mercurio en aves.

El estudio se realizó con una población de 160 pollos (Hybro-g) y fueron alimentados durante 42 días con una dieta basal (control) o con una dieta suplementada con diferentes compuestos: Hg(II), MeHg, Se(IV), sepiolita o bentonita.

Se determinaron la ganancia de peso y eficiencia del alimento a los 0, 21 y 42 días del estudio.

Con el fin de evaluar la distribución del mercurio y selenio, y el efecto que el Se y las arcillas ejercían sobre la distribución y bioacumulación del mercurio se evaluó la concentración de ambos elementos en distintas partes del animal: riñón, hígado, músculo y piel.

La determinación del contenido de mercurio y selenio total se llevó a cabo mediante las técnicas de CV-AFS y GH-AFS, previa digestión ácida en microondas y posterior reducción con HCl (en el caso del Se).

En el segundo trabajo (sección 2) **“Selenium long-term administration and its effect on mercury toxicity”** se estudió el efecto antagonico de la toxicidad del mercurio que ejerce el selenio y los posibles mecanismos de detoxificación implicados. Además se evaluó el proceso de acumulación y transformación de selenio a través de la cadena trófica y se desarrolló un método *in vitro* para la determinación del contenido de selenio total y sus especies bioaccesibles.

El estudio se realizó con una población de 72 pollos (Hybro-g) que fueron alimentados durante 42 días con una dieta basal rica en selenio (control) o con una dieta suplementada con: Hg(II), MeHg y Se(IV).

Los estudios se realizaron sobre diversas partes del animal: riñón, hígado y músculo.

Los contenidos totales de ambos elementos se determinaron mediante las técnicas CV-AFS e ICP-MS, después de un proceso de digestión de cada muestra.

Se identificaron las formas químicas de Hg y Se y posibles biotransformaciones de estos elementos como resultado de su interacción.

La extracción de las especies de Se se realizó a través de un proceso enzimático desarrollado previamente. La separación y detección de las especies de selenio se logró mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.



Las especies de Hg extraídas se estudiaron mediante el acoplamiento CV-AFS, empleando una reducción selectiva.

En el tercer trabajo (sección 3) ***“Mercury-Selenium interaction in chicken liver by size exclusion chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry”*** (J. Anal. At. Spectrom., 2005, aceptado) se abordó el estudio de la interacción Hg-Se en hígado de pollo cuando ambos elementos son administrados simultáneamente a través de la dieta.

Con el fin de clarificar el metabolismo del Hg y los procesos por los que el Hg y el Se interaccionan se estudió la distribución de las especies solubles de ambos elementos en función del peso molecular.

Además, el estudio se amplió a otros metales, tóxicos y esenciales, estudiándose la distribución de los compuestos de S, P, Cu, Zn, Mn y Fe en función del tamaño, y su posible modificación después de una exposición prolongada a Hg y Se.

El estudio se realizó sobre hígado de pollos que fueron alimentados durante 42 días con una dieta basal o suplementada con Hg(II), MeHg y Se(IV).

En el trabajo se optimizaron diversos parámetros que afectan a la separación de las biomoléculas, tales como el pH, caudal, concentración y fuerza iónica de la fase móvil.

El análisis de la fracción proteica se llevó a cabo por cromatografía de exclusión molecular (SEC) con detección por UV e ICP-MS.

Los contenidos totales de ambos elementos se determinaron mediante los acoplamientos CV-AFS y HG-AFS, después de un proceso de digestión de cada muestra.

## 1. EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO DE PIENSOS CON SELENIO Y ARCILLAS EN LA BIOACUMULACIÓN DE MERCURIO

A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara.

“Effect of animal feed enriched with Se and clays on Hg bioaccumulation in chickens: in vivo experimental study”

***J. Agric. Food Chem.***, 2005, 53, 2125-2132.

Estudios preliminares se presentaron como comunicación oral invitada en “5<sup>th</sup> International Symposium on Speciation of Elements in Biological, Environmental and Toxicological Sciences”, Almuñecar. 12-15 de Septiembre 2003.

El trabajo completo se presentó como poster en “2<sup>nd</sup> International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food”, Bruselas, Bélgica. 6-8 Octubre 2004.

## Effect of Animal Feed Enriched with Se and Clays on Hg Bioaccumulation in Chickens: In Vivo Experimental Study

ANA I. CABAÑERO, YOLANDA MADRID, AND CARMEN CÁMARA\*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

An in vivo experiment was conducted to evaluate the effects of sodium selenite, sepiolite, and bentonite on inorganic mercury (Hg) and methylmercury (MeHg) bioaccumulation. For this purpose 160 chickens were fed under different controlled conditions. Chickens were exposed to Hg(II) and MeHg added to feed with or without selenium or clays supplementation. No significant differences were observed in the voluntary intake and feed/gain conversion rates. The target organs of Hg(II) and MeHg in chickens were the liver and kidney, respectively, but the greatest body store was the muscle in both cases. A higher bioaccumulation for MeHg than for Hg(II) was observed. The results showed that addition of sodium selenite, sepiolite, or bentonite induced a decrease of up to 60–100% in the inorganic mercury bioabsorption. Bentonite addition to a MeHg-containing diet also caused a decrease in organic mercury bioaccumulation (29–67%). On the other hand, inorganic selenium and sepiolite did not decrease MeHg accumulation.

**KEYWORDS:** Selenium; mercury; bioaccumulation; chicken; animal feed; clays

### INTRODUCTION

Mercury (Hg) is a widespread and persistent pollutant in the environment and is among the most highly bioconcentrated trace metals in the human food chain. Mercury toxicity, bioavailability, and environmental mobility are well-known to be highly dependent on its chemical form (1). Organic mercury compounds are of special concern because of their easier penetration through biological membranes, more efficient bioaccumulation, higher stability, and slower elimination from tissues (2) compared to inorganic mercury, and methylmercury (MeHg) is one of the most important Hg species in terms of bioaccumulation and risk.

Selenium (Se) is an essential micronutrient for humans, a constituent of enzymes, and is also well-known for its potential in disease prevention (3). Several authors consider that selenium can act as a potential antagonist of mercury toxicity (4, 5), but the way in which it interferes with mercury is still uncertain; several mechanisms have been proposed to explain this interaction, although none of them is conclusive (6). Some of the more likely hypotheses are that Se may promote a redistribution of Hg from more sensitive organs (kidney, central nervous system) to less sensitive ones (muscle), that there is competition of Se for the same receptors, that complexes, such as tiemannite (7) or Se–Hg–S species, are formed (8) and that MeHg conversion into less toxic forms is promoted and oxidative damage prevented (9).

During the past decade some contamination events of animal feed in Europe, such as a dioxin contamination episode in

Belgium in May 1999, have been detected. Therefore, measures have been introduced by the European Union to protect and improve the quality of human health (10).

Nowadays, fish meal is used as a source of protein in feed for poultry and swine (11) in Europe. Poultry, swine, and fish fed these meals could concentrate mercury to undesirable levels if care is not taken (12). Even low levels of fish meals containing mercury fed to swine and poultry can cause mercury accumulation in the flesh exceeding  $0.03 \text{ mg kg}^{-1}$ , the maximum residue limit (MRL) in most countries for nonfish food stuffs (12). Actually, experiments in feeding fish meal to poultry have shown that tissue mercury accumulation correlates with the mercury concentration of the meal (13).

Therefore, meat from animals fed fish meal or other fish products is likely to contribute to the exposure to mercury (11). In fact, such exposure could explain previous findings of unexpectedly high MeHg levels found in individuals with low fish consumption and a possible influence of chicken consumption on the concentration of MeHg in human umbilical cord blood (13).

Removing Hg effects from contaminated foodstuffs remains a major problem. One approach could be to use non-nutritive adsorbing materials in the diet in order to bind Hg and reduce its absorption from the gastrointestinal tract or the use of agents that could act as antidotes or antagonize the toxic effect of Hg(II) and MeHg. Non-nutritive adsorbing materials such as cation exchangers (e.g., zeolites) have been previously used in the diet to bind Hg and reduce its absorption from the gastrointestinal tract (14). However, no data about the use of other non-nutritive adsorbing material such as clays has been published.

Clays are characterized by their micrometer-sized particles, swelling properties, large surface areas, high cation exchange

\* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail ccamara@quim.ucm.es).

**Table 1.** Experimental Setup

treatment	no. of pens	total no. of chickens
basal diet		
control	1	8
+ selenium (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)	1	8
+ bentonite (2 g kg <sup>-1</sup> in feed)	1	8
+ sepiolite (2 g kg <sup>-1</sup> in feed)	1	8
basal diet + Hg(II) [0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed]		
control	2	16
+ selenium (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)	2	16
+ bentonite (2 g kg <sup>-1</sup> in feed)	2	16
+ sepiolite (2 g kg <sup>-1</sup> in feed)	2	16
basal diet + MeHg [0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed]		
control	2	16
+ selenium (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)	2	16
+ bentonite (2 g kg <sup>-1</sup> in feed)	2	16
+ sepiolite (2 g kg <sup>-1</sup> in feed)	2	16
total	20	160

capacity, chemical stability, and charge distribution. On the basis of their physical and chemical properties, these products are widely employed as additives (binders, anticaking agents, coagulants, lubricants, or agglomerate) in foodstuffs, although they are generally present as a minor component depending on the established regulation of each country (1–2% w w<sup>-1</sup>) (10). Recently a role as enhancer of the nutritive value of diets in ruminants and monogastric animals has been also proposed (15).

The special characteristics of sepiolite make it ideal for use as an adsorbent for toxins, bacteria, and even viruses in the intestine (16), as pharmaceutical excipients, or as active ingredients (17), as well as lubricants of ground diets and as a pelleting agent during feed processing procedures. With these characteristics, it might promote significant modifications in the physical and chemical properties of digesta contents (15).

Bentonite is used as an animal feed supplement and as a pelleting aid in the production of the animal feed pellets, as well as a flowability aid for unconsolidated feed ingredients such as soy meal. It is also used in the removal of impurities in oils and as a clarification agent in drinks such as beer, wine, and mineral water. It also has been shown to reduce the toxic effect of aflatoxins contained in fish food (18).

In this work several studies have been performed to evaluate, on the one hand, the mercury distribution and possible modifications in naturally occurring levels of Se and, on the other, the effect of Se, bentonite, and sepiolite administration on mercury distribution and bioaccumulation in broiler chickens.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals, Diets, and Experimental Setup.** One hundred and sixty 1-day-old Hybro-G female broiler chickens were used in this study. The birds were randomly assigned into 20 pens for treatment, each of 8 birds. All pens were bedded with a wood-shavings litter and equipped with feeders and waterers in an environmental chamber with 37.5 cm<sup>2</sup> per bird.

The chickens (during a study period of 42 days) were fed either with a common basal diet (control), formulated to contain all nutrients required, or with a diet supplemented with different compounds [Hg(II), MeHg, Se(IV), sepiolite, or bentonite] specified in **Table 1**. Ingredients and chemical composition of the basal diet are shown in **Table 2**.

The diets and fresh water were offered ad libitum. Lights were on for 24 h during the first 3 days, after which a lighting schedule was applied consisting of 20 h of light and 4 h of darkness. The light intensity was reduced gradually during the experiment.

**Table 2.** Composition of the Basal Diet Used in the Experiments

ingredient	0–42 days (%)
barley	5.000
wheat	30.000
maize	18.568
soyabean	35.903
soja oil	6.453
calcium carbonate	0.564
dicalcium phosphate	2.267
sodium chloride	0.299
sodium carbonate	0.186
DL-methionine	0.159
Avizyme 1300	0.100
SV-5211-MxMa	0.500
total	100.000
analysis	
true metabolizable energy (kcal/kg)	3075
dry matter	88.55
PB	22.18
EE	8.50
FB	2.63
ash	6.28
carbohydrates	32.57
sugars	4.64
calcium	0.91
phosphorus	0.75
available phosphorus	0.45
Cl	0.22
sodium	0.18
lysine	1.23
methionine	0.55
methionine + cystine	0.93
Thr	0.84
Trp	0.28
lysine av	1.07
methionine + cystine av	0.82
Thr av	0.69
Trp av	0.24
LI-C18:2	4.60
Na + KCl	260
unsaturated	6.95
saturated	1.20

The chickens were weighed at 0, 21, and 42 days of age to determine gains in body weight and feed efficiency. Mortality was recorded as it occurred (**Table 3**). During the experiment, temperature and humidity were registered. These conditions were in accordance with animal welfare.

The experimental design consisted of 12 different dietary treatments (**Table 1**), to evaluate the effect of selenium, sepiolite, and bentonite on mercury bioaccumulation.

At the end of day 42, the experiment was finished. For evaluation of mercury bioaccumulation in the indicated cases, all birds were slaughtered. The carcasses were manually eviscerated, and the liver, skin, kidney, and muscle of each chicken were collected and stored individually at –18 °C. The frozen organs from six animals/group were individually blended and oven-dried at 40 °C for 2 days and stored at –18 °C until analysis.

**Instrumentation.** An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Merlin 10.023, P. S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, U.K.) was used to determine the total mercury content. Mercury vapor was generated in a flow injection system using a multichannel peristaltic pump (Gilson, Villiers-le-be, France), a six-way injection valve (Omnifit, Cambridge, U.K.), and a gas–liquid separator. The separator was coupled to a commercial dryer membrane (Perma Pure Products, Farmingdale, NJ) to eliminate the moisture, and both together were used as an interface for CV-AFS.

An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Excalibur, P. S. Analytical Ltd.) was used to determine the total selenium content. Selenium hydride was generated in a flow injection system using a peristaltic pump (Gilson) and a gas–liquid separator. The separator was coupled to a commercial dryer membrane (Perma Pure Products) to eliminate the moisture, and both together were used as an interface for HG-AFS.

**Table 3.** Effect of Hg, MeHg, Se, Bentonite, and Sepiolite on Body Weight Gain and Food Conversion<sup>a</sup>

treatment	bird body wt (g), day 0	bird body wt gain (g), day 21	bird body wt gain (g), day 42	food conversion ratio [g of food (g of gain <sup>-1</sup> ), day 21	food conversion ratio [g of food (g of gain <sup>-1</sup> ), day 42	mortality (%)
basal diet						
control	43 ± 2	733 ± 30	2426 ± 98	1.56 ± 0.05	1.72 ± 0.08	12
+ selenium	42 ± 1	726 ± 41	2389 ± 95	1.68 ± 0.06	1.69 ± 0.07	12
+ bentonite	42 ± 2	752 ± 32	2405 ± 78	1.59 ± 0.06	1.77 ± 0.07	0
+ sepiolite	41 ± 3	769 ± 45	2415 ± 89	1.67 ± 0.07	1.77 ± 0.09	12
basal diet + CH <sub>3</sub> ClHg						
control	43 ± 2	795 ± 29	2451 ± 85	1.54 ± 0.05	1.76 ± 0.08	6
+ selenium	42 ± 2	769 ± 42	2359 ± 101	1.50 ± 0.06	1.72 ± 0.08	0
+ bentonite	41 ± 3	775 ± 27	2464 ± 90	1.59 ± 0.07	1.78 ± 0.09	0
+ sepiolite	42 ± 2	758 ± 27	2357 ± 100	1.55 ± 0.06	1.75 ± 0.10	0
basal diet + HgCl <sub>2</sub>						
control	41 ± 3	749 ± 32	2472 ± 91	1.52 ± 0.05	1.70 ± 0.06	6
+ selenium	42 ± 2	798 ± 41	2462 ± 98	1.52 ± 0.05	1.74 ± 0.08	6
+ bentonite	42 ± 3	802 ± 38	2452 ± 96	1.54 ± 0.07	1.74 ± 0.07	0
+ sepiolite	41 ± 2	774 ± 33	2281 ± 93	1.55 ± 0.07	1.76 ± 0.09	6

<sup>a</sup> Results expressed as mean value ± SD.

For total Hg and Se determination, samples were microwave digested in double-walled advanced composite vessels using an oven with a power of up to 1000 W (MSP, CEM, Matthews, NC).

**Reagents.** Mercury standards solutions were prepared by appropriate dilution of a stock mercury chloride solution [1000 mg Hg(II) L<sup>-1</sup>] (Merck, Darmstadt, Germany) and methylmercury chloride [1000 mg MeHg L<sup>-1</sup>] (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in deionized Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA). These solutions were stored in amber vials at -18 °C. Standards were prepared daily to reduce mercury losses by volatilization.

Inorganic selenium solution was obtained by dissolving sodium selenite (Merck) in deionized Milli-Q water. Stock solutions of 10 mg Se(IV) L<sup>-1</sup> were stored in the dark at 4 °C. Working standard solutions were prepared daily by dilution.

Sepiolite (Exal UE-562, Tolsa, S.A., Madrid, Spain) and bentonite (Toxisorb, Lohmann Animal Health GmbH & Co., Cuxhaven, Germany) were added to the basal diet.

Stannous chloride (3% w v<sup>-1</sup>), used as a reducing agent for Hg(II) in CV-AFS, was prepared by dissolving the appropriate mass of stannous chloride, anhydrous (Merck), in 3 M hydrochloric acid that had been prepared by diluting 12 M hydrochloric acid (Merck) with ultrapure water.

Sodium tetrahydroborate 0.5% (w v<sup>-1</sup>), used as a reducing agent for Se(IV) in HG-AFS, was prepared by dissolving NaBH<sub>4</sub> powder (Merck, Steinheim, Germany) in deionized Milli-Q water, stabilized in 0.15% (w v<sup>-1</sup>) NaOH, and filtered to eliminate turbidity.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) were used for acid digestion of samples.

Argon (purity = 99.999%, Carbueros Metálicos, Barcelona, Spain) was used as a makeup gas, sheath gas at the transfer line, and carrier gas with AFS, respectively.

**Measurements. Total Mercury Quantification.** To determine the total mercury content, the dry samples (50–200 mg) were digested with 1–2 mL of concentrated nitric acid and 0.5 mL of 35% hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 43% power output. The pressure was held at 20 psi for 15 min, at 40 psi for 30 min, and finally at 85 psi for 1 h.

Total mercury concentration was determined by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by the continuous mercury cold vapor system connected to AFS equipment. A flow rate of 2.5 mL min<sup>-1</sup> (3 M hydrochloric acid) and a similar flow rate of the reductant solution (3% stannous chloride in 3 M hydrochloric acid) were used to generate the mercury cold vapor.

**Total Selenium Quantification.** The samples followed the same acid digestion as mentioned for total mercury quantification.

Se(VI) was reduced to Se(IV) by adding concentrated hydrochloric acid (6 M final concentration) to the digest and heating at 95 °C for 1 h. The solutions were then diluted to 25 mL with Milli-Q water.

Total selenium concentration was determined by the continuous selenium hydride system connected to AFS equipment. A flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup> (3 M hydrochloric acid) and a similar flow rate of the reductant solution (1% sodium tetrahydroborate w v<sup>-1</sup>) were used to generate the selenium hydride.

**Validation of the Results.** In the present work, two certified reference materials were employed for validation of the methodologies used. Method validation for mercury was performed by using the reference material CRM-463 (tuna fish), certified for methylmercury (2.85 ± 0.16 µg g<sup>-1</sup>), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR), whereas for total selenium a marine tissue reference material (Murst-ISS A2), certified for total selenium (7.37 ± 0.91 µg g<sup>-1</sup>) from Institute for Reference Materials and Measurements, was used.

Because, at the 95% confidence level, no significant differences were detected between the certified value and the experimental one [(2.86 ± 0.10 µg of Hg g<sup>-1</sup>) and (7.41 ± 0.6 µg of Se g<sup>-1</sup>)], the method used was considered to be accurate for total mercury and selenium determination.

**Statistical Analysis.** A one-factor analysis of variance was applied to detect possible differences in total mercury and selenium between the different treatments studied. A significance level of *P* < 0.05 was adopted for all comparisons. Statgraphics Plus version 4.0 (Statistical Graphics) was used for the statistical analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Feed Intake and Growth.** Data presented in **Table 3** show the effect of the 12 dietary treatments on body weight gain and feed conversion ratios of broilers at 0, 21, and 42 days of age. Neither selenium nor clays (sepiolite and bentonite) added to the basal diet had a significant effect on feed conversion. These data agree with the findings of other authors, who reported similar results for sepiolite and bentonite (15, 19–20).

Furthermore, the results show that chickens fed with a mercury concentration of 0.2 mg kg<sup>-1</sup> with or without Se and clays had similar weight gains up to 42 days.

No differences were found in feed conversion among treatments and between groups on the 12 treatments (*P* < 0.05). Therefore, the inclusion of Hg(II), MeHg, Se(IV), bentonite, and sepiolite did not affect food conversion.

**Evaluation of Hg(II) and MeHg Bioaccumulation.** To evaluate mercury bioaccumulation, total mercury content of the chickens fed Hg(II) and MeHg supplementation was determined (**Table 4**).

**Table 4.** Total Mercury Concentrations and Distribution Found in Fresh Weight Chicken Tissues after Hg(II) and MeHg Supplementation

chicken tissue	treatment			
	basal diet + Hg(II) (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)		basal diet + MeHg (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)	
	total Hg <sup>a</sup> (μg kg <sup>-1</sup> )	distribution (%)	total Hg <sup>a</sup> (μg kg <sup>-1</sup> )	distribution (%)
kidney	85 ± 24	15	190 ± 70	2
liver	22 ± 4	12	304 ± 36	10
muscle	6 ± 3	72	113 ± 27	85
skin	1.1 ± 0.5	1	33 ± 9	3

<sup>a</sup> Results of six independent chickens for each group. Three replicates for each measurement (mean value ± SD).

The total Hg contents in the chicken tissues were compared for the two groups to ascertain whether there was any difference in the accumulation process depending on tissue and Hg species exposure. Hg accumulation and distribution pattern were differentially affected by the species ( $P > 0.05$ ), even though the diets had the same total Hg content (Table 4).

Total mercury concentrations in the kidney and liver of the chicken treated with Hg(II) were 1 order of magnitude higher than those in muscle or skin. A similar situation was observed for MeHg except for the muscle.

Assuming that 55.6% of carcass weight is muscle, 2.3% is liver, 0.7% is kidney, and 6% is skin and that Hg is evenly distributed throughout these tissues, 11.3 μg of total Hg(II) and 180.4 μg of total MeHg were bioaccumulated in the chickens analyzed. Therefore, this experimental animal study showed a higher MeHg bioavailability (20.7%) compared to Hg(II) bioavailability (1.3%). It was also noted that the greatest body store of Hg(II) and MeHg in chicken was the muscle, kidney being the target organ when Hg(II) was added to the diet and liver when MeHg was added.

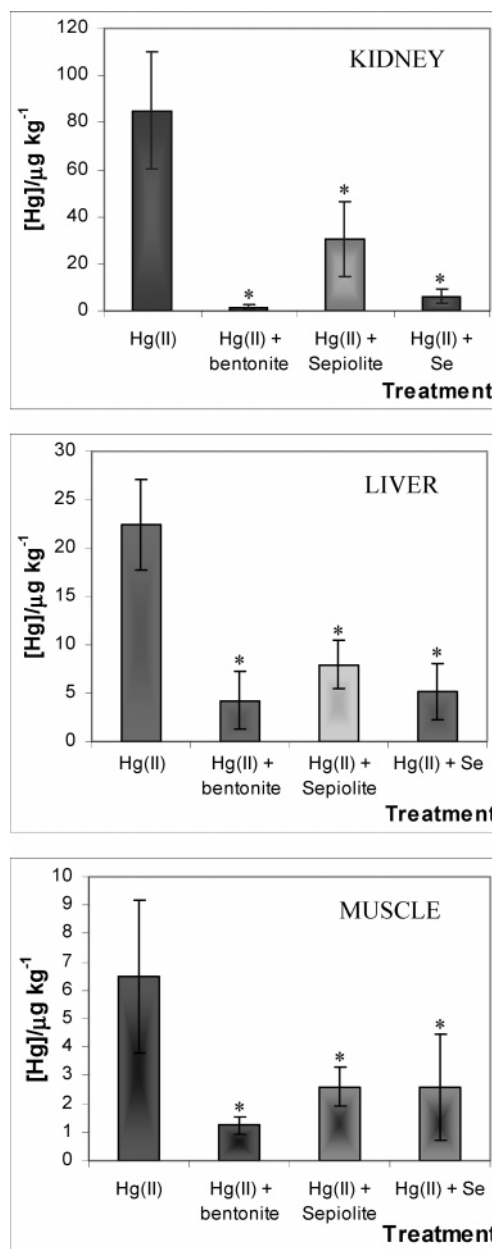
Therefore, we can conclude that Hg(II) is not highly bioaccumulated in chicken, kidney being the tissue most sensitive to inorganic mercury poisoning, as previously reported (6, 14, 21–23). This is due to its low gastrointestinal absorption and the fact that inorganic mercury accumulates in the proximal convoluted tubules of the kidney (24, 25), because the urinary route is one of the main pathways for its elimination (26). Meanwhile, methylmercury is almost completely absorbed from the gastrointestinal tract (24) and excreted to only a very limited extent (27), and as a result of MeHg attachment to sulfhydryl groups and binding to proteins on membranes and to enzymes (26, 28), a higher accumulation in the chicken is observed.

All of the control groups showed no evidence of Hg contamination.

**Hg(II) and MeHg Bioavailability. A. Selenium Treatment.** The protective effect of sodium selenite against the toxicity of mercuric chloride, when both compounds are co-administered, in mammals has been known for three decades. The first report on this subject was published by Parizek et al. (29), who reported on the alleviation of Hg(II) toxicity by sodium selenite simultaneously administered to rats, showing a protective effect against the renal necrosis and mortality caused by mercuric chloride. Since then, many studies dealing with this phenomenon have been published (6, 21, 23, 25, 30–35).

To clarify the interaction between Se and Hg(II) and MeHg and to elucidate its significance, an experimental in vivo study has been carried out. In this particular case we tested Se as a possible antagonist of Hg in broiler chicken.

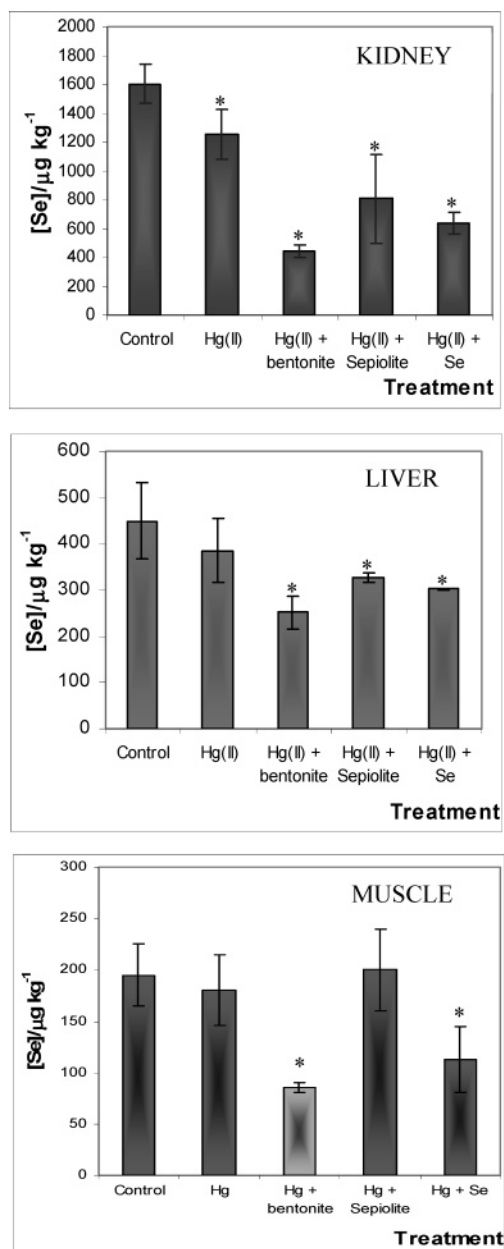
The Hg levels bioaccumulated in liver, kidney, and muscle of chickens fed with Hg(II) and Se(IV) are shown in Figure 1.



**Figure 1.** Mercury bioaccumulation in chicken tissues after Hg(II), Hg(II)–bentonite, Hg(II)–sepiolite, and Hg(II)–Se(IV) treatments: \*, significant differences between Hg(II)-exposed chickens and [Hg(II) + bentonite]-, [Hg(II) + sepiolite]-, or [Hg(II) + Se]-exposed chickens ( $P < 0.05$ ).

As can be seen, the addition of Se to the Hg(II)-containing diet significantly ( $P < 0.05$ ) alleviated the adverse accumulation of Hg in chicken. The whole-body retention of mercury was drastically decreased, Hg concentration in all tissues being highly affected by Se administration, but the kidney remained the target organ. A drastic reduction in total Hg content between 60 (muscle) and 100% (skin) was observed, the highest concentrations in the kidney being 6 and 85 μg kg<sup>-1</sup> (wet weight) for chicken with and without Se treatment, respectively.

Hence, not only Hg accumulation but distribution pattern (muscle, 89%; liver, 8%; and kidney 3%) compared to the previous distribution results from Table 4 was affected by the addition of sodium selenite. This fact is in agreement with other authors who assume that selenium protection must involve a change in the distribution of mercury on a subcellular level (6, 21).



**Figure 2.** Selenium bioaccumulation in chicken tissues after Hg(II), Hg(II)–bentonite, Hg(II)–sepiolite, and Hg(II)–Se(IV) treatments: \*, significant differences between control chickens and [Hg(II)], [Hg(II) + bentonite], [Hg(II) + sepiolite], or [Hg(II) + Se]-exposed chickens ( $P < 0.05$ ).

As a consequence, selenium addition reduced mercury accumulation and promoted a redistribution of Hg from more sensitive organs (kidney, liver) to a less sensitive one (muscle). Therefore, Se influences tissue accumulation through tissue-specific mechanisms.

Several studies on mice, rats, and pigs have shown that Se markedly reduced the mercury content in the kidneys but, in contrast, most of them showed a general trend toward increasing mercury levels in the liver (21, 23, 25). The addition of selenite to inorganic mercury diets also caused a shift in the tissue mercury distribution.

The presence of Hg(II) did not cause a relevant effect on naturally occurring levels of Se bioaccumulation in liver, muscle, and skin (Figure 2). However, it did affect Se accumulation in kidney, but bioaccumulation order (kidney > liver > muscle > skin) remained unaltered.

On the other hand, the addition of Se to the Hg(II)-containing diet affected the Se bioaccumulation in all tissues.

Taking into account that 90% of the total Se has been found to be selenomethionine (SeMet) in the feed used for the target chicken, a possible interaction among SeMet, Hg, and Se(IV) may explain the differences found in Se bioaccumulation under the two different treatments previously described. In fact, the response of animals (rats, chicks) to inorganic mercury after the administration of selenite has been found to be more immediate than that with selenate or selenomethionine (31, 33), but no studies on selenite, selenomethionine, and inorganic mercury presented simultaneously in food have been reported to date.

Furthermore, unlike what happened with Hg accumulation, the Se distribution pattern remained unchanged (muscle, 82–84%; liver, 7–10%; and kidney, 8–9%) in the control group, Hg(II) group, and Hg(II) + Se group. Therefore, mercury inhibited selenium absorption without altering the whole-body distribution of selenium.

Although the mechanism of this finding is not clear, the results are similar to earlier papers showing that dietary exposure to other toxic metal significantly reduces the absorption of selenite in chicks (31, 36, 37).

The protective effect of sodium selenite used in this study against the toxic accumulation of Hg(II) was as great as had been predicted. Therefore, these improvements should contribute to a solution of a possible inorganic mercury problem in poultry.

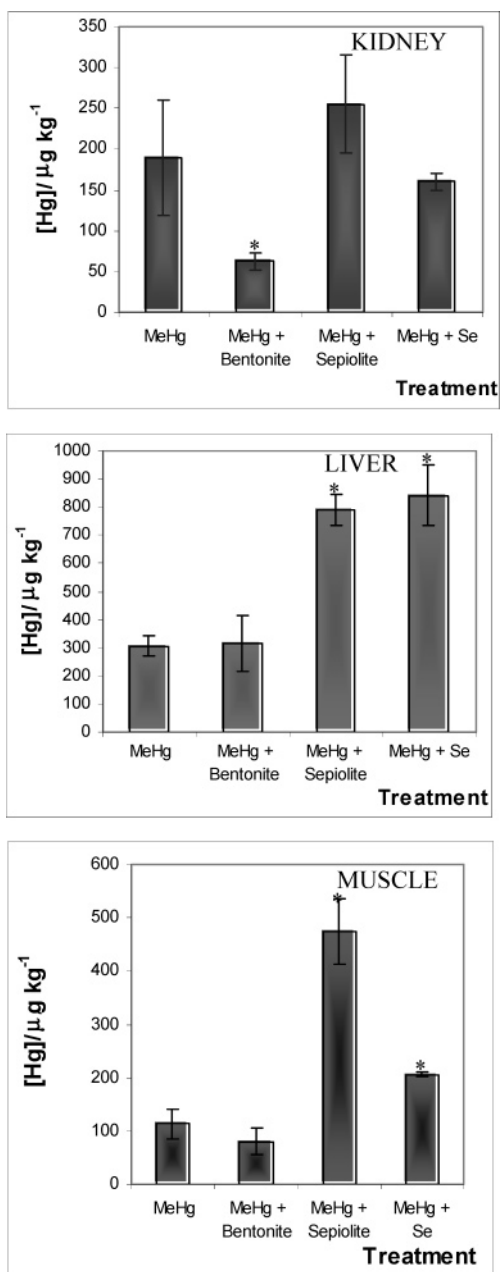
In addition, the antagonism by Se of the toxicity of inorganic mercury and its detoxifying effect on MeHg attracted the attention of many scientists in heavy metal toxicology (32). Ganther et al. were the first to report the interaction of MeHg and Se. Their results clearly showed the alleviating effects of Se on MeHg-induced mortality and the suppression of weight gain in rats. The results of several studies also suggest that when Se is co-administered with MeHg, the fetotoxicity, neurotoxicity, or developmental toxicity of MeHg is alleviated (38). Although many studies on the fate of MeHg in animals have been performed, the mechanisms regulating distribution in tissues and excretion have not yet been examined in detail. Thus, as outlined above, the interactions between Se and MeHg in broiler chickens has been evaluated in this study.

In Figure 3 the mean values of MeHg expressed as total mercury concentration found in the liver, kidney, and muscle are presented. As can be seen, the addition of Se to the MeHg-containing diet did not affect the mercury accumulation in kidney ( $P < 0.05$ ), but Hg concentration in liver and muscle was highly affected by Se administration (as selenite), with the liver remaining as the target organ. Under selenite administration, organic Hg concentration in muscle reached kidney levels and 2.8-fold higher bioaccumulation was found in the liver.

Despite this, selenium did not significantly change the relative mercury distribution (muscle, 83–84%; liver, 15–16%; and kidney, 1%) in the MeHg and MeHg + Se groups, respectively.

The effect of Se on MeHg accumulation was different from that expected, with an increase in its accumulation especially in liver.

It is known that Se reduces the biliary secretion of MeHg. Urano et al. (40) suggested that the decrease in biliary secretion of MeHg induced by Se may result from inhibition of the pathway for secretion of MeHg from liver to bile, rather than the formation of a complex between methylmercury and selenium. Se may specifically inhibit the activity of the canalicular transporter(s) involved in active transport of GSH from liver to bile (40). As a result, a slow biliary excretory



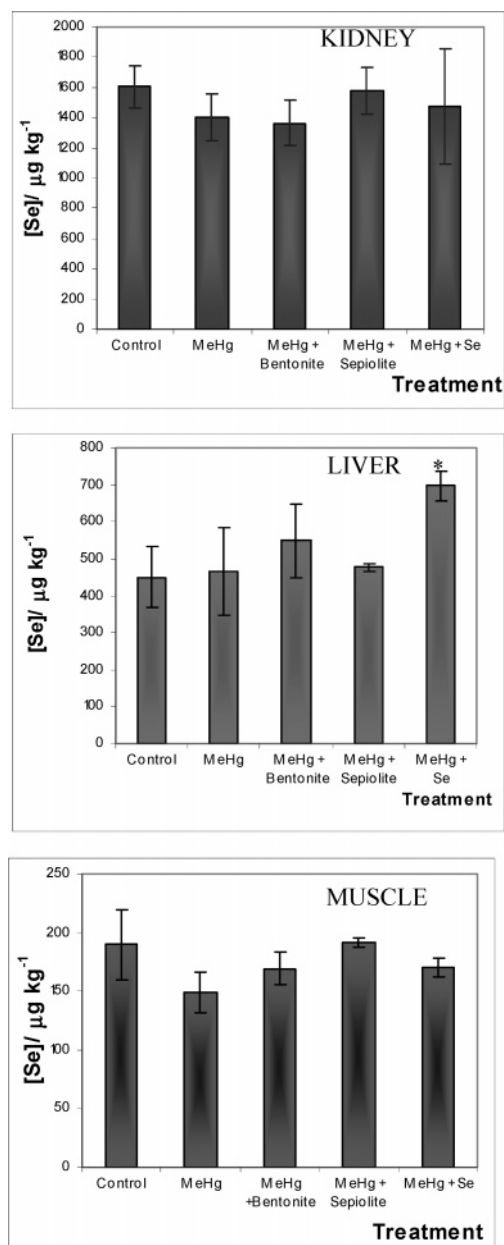
**Figure 3.** Mercury bioaccumulation in chicken tissues after MeHg, MeHg–bentonite, MeHg–sepiolite, and MeHg–Se(IV) treatments: \*, significant differences between MeHg-exposed chickens and [MeHg + bentonite]-, [MeHg + sepiolite]-, or [MeHg + Se]-exposed chickens ( $P < 0.05$ ).

process would retard whole-body elimination of the metal and favor, thus, its accumulation (41).

Therefore, this inhibitory effect of selenium could be due to a MeHg detoxification pathway involving the liver.

Similar results have been previously reported (40, 42–47) in which the hepatic Hg level in rats, quails, hens, and mice also increased by the presence of Se.

The presence of MeHg did not cause a relevant effect on naturally occurring levels of Se bioaccumulation (Figure 4). In contrast, the addition of Se to the MeHg-containing diet (Figure 4) did not affect the Se accumulation in kidney, muscle, and skin, but Se concentration in liver, was increased, with the kidney as the target organ. Furthermore, unlike what happened with inorganic mercury, the Se accumulation pattern was affected when MeHg (muscle, 78%; liver, 11%; and kidney,



**Figure 4.** Selenium bioaccumulation in chicken tissues after MeHg, MeHg–bentonite, MeHg–sepiolite, and MeHg–Se(IV) treatments: \*, significant differences between control chickens and [MeHg]-, [MeHg + bentonite]-, [MeHg + sepiolite]-, or [MeHg + Se]-exposed chickens ( $P < 0.05$ ).

10%) or MeHg + Se (muscle, 77%; liver, 14%; and kidney, 9%) was added to chicken feed, in comparison to the control group (muscle, 84%; liver, 7%; and kidney, 9%).

Hence, MeHg promoted Se redistribution from muscle to the liver, suggesting that a mercury–selenium interaction occurred in this organ. This fact also indicates a possible correlation of MeHg and Se, when both are co-administered.

The data presented here emphasize that the relationship between Se and Hg, whereby Hg metabolism by animals is modified, is quite complex and not well understood.

**B. Clays Treatment.** In this study the evaluation of the capacity to reduce Hg(II) and MeHg accumulation of two different clays (bentonite and sepiolite) was performed.

Results for inorganic mercury are detailed in Figure 1. Sepiolite and bentonite incorporation at 2 g kg<sup>-1</sup> of feed significantly reduces the concentration of Hg in all chicken



tissues [between 64 (muscle) and 100% (skin)], the best results being for bentonite (81–100%).

Results similar to those reported in the present study were found in a study where 5% clinoptilolite dietary supplement was added to feed enriched with Hg (14).

However, the presence of clays in the diet considerably decreases the natural Se content found in the different tissues tested (**Figure 2**), but the bioaccumulation order remained unaltered, kidney > liver > muscle > skin.

Consequently, we concluded that sepiolite and bentonite supplementation may greatly diminish Hg(II) bioaccumulation on broiler chicken. Therefore, these clays could act as promising mercury protectors at low cost.

With regard to MeHg, the results of this experiment are summarized in **Figure 3**. Sepiolite and bentonite have remarkably different behaviors on MeHg bioaccumulation in broiler chickens.

A significant interaction ( $P < 0.05$ ) between bentonite and MeHg is observed in the kidney and muscle, where MeHg expressed as total Hg content was reduced 67 and 29%, respectively, whereas the mercury found in the liver remained unaltered.

On the other hand, the addition of sepiolite to the MeHg-containing diet did not affect Hg accumulation in kidney, but Hg concentration in liver, muscle, and skin was highly affected, the liver being the target organ. Hg concentration in muscle exceeds in this case the levels found in liver without clay addition, leading to 2.6-fold higher bioaccumulation.

As a consequence, sepiolite addition seems to cause an effect on MeHg accumulation similar to that Se addition had on MeHg accumulation. On the other hand, Se bioaccumulation was not reduced (**Figure 4**), in contrast to what happened when clay and Hg(II) were added to the diet.

In conclusion, this study shows that the addition of bentonite to the diet can be beneficial to chickens consuming MeHg-contaminated food. In addition, further studies targeted on Hg are proposed to clarify whether sepiolite enhances MeHg accumulation or MeHg conversion into less toxic forms affects their further accumulation.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Almudena Antón and Angel Fernández for their contribution to this work (obtaining, identifying, and collecting of the samples).

#### LITERATURE CITED

- Río-Segade, S.; Bendicho, C. Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection-cold vapor technique. *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *14*, 263–268.
- Tao, G.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E. Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapor generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion. *Analyst* **1998**, *123*, 1215–1218.
- Pyrzyska, K. Analysis of selenium species by capillary electrophoresis. *Talanta* **2001**, *55*, 657–667.
- Egeland, G. M.; Middaugh, J. P. Balancing fish consumption benefits with mercury exposure. *Science* **1997**, *278*, 1904–1905.
- Ebdon, L.; Pitts, L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F. X.; Quevalliller, P. *Trace Element Speciation for Environment and Health*, 1st ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 2001.
- Cuvin-Aralar, M. A. A.; Furness, R. W. Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1991**, *21*, 348–364.
- Das, K.; Jacob, V.; Bouquegneau, J. M. White-sided dolphin metallothioneins: purification, characterisation and potential role. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2002**, *131*, 245–251.
- Gailer, J.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Madden, S.; Prince, R. C.; Yu, E. Y.; Denton, H. S.; Younis, H. S.; Aposhian, H. V. Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 1135–1142.
- Hoffman, D. J.; Heinz, G. H. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in mallard ducks. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 161–166.
- Abad, E.; Llerena, J. J.; Saulo, J.; Caixach, J.; Rivera, J. Comprehensive study on dioxin contents in binder and ant-caking agent feed additives. *Chemosphere* **2002**, *46*, 1417–1421.
- Lindberg, A.; Ask Bjornberg, K.; Vahter, M.; Berglund, M. Exposure to methylmercury in non-fish-eating people in Sweden. *Environ. Res.* **2004**, *96*, 28–33.
- Savage, G. P. Mercury in fish and fishmeals. Trace Elements: Roles and Risks. *Proceedings of the New Zealand Trace Elements Group Conference*; 1992; pp 11–22.
- Ask Bjornberg, K.; Vahter, M.; Petersson-Grawé, K.; Glynn, A.; Cnattingius, S.; Darnerud, P. O.; Atuma, S.; Aune, M.; Becker, W.; Berglund, M. Methylmercury and inorganic mercury in Swedish pregnant women and in cord blood: influence of fish consumption. *Environ. Med.* **2003**, *111*, 637–641.
- Lysenco, M. Prevention of mercury accumulation in broiler organs. *Poult. Int.* **2000**, 38–39.
- Ouhida, I.; Pérez, J. F.; Piedrafita, J.; Gasa, J. The effects of sepiolite on broiler chicken diets of high, medium and low viscosity. Productive performance and nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2000**, *85*, 183–194.
- Martindale, W. *The Extra Pharmacopoeia*, 28th ed.; Pharmaceutical Press: London, U.K., 1982; p 2025.
- Viseras, C.; Lopez-Galindo, A. Pharmaceutical application of some Spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies. *Appl. Clay Sci.* **1999**, *14*, 69–82.
- Kececi, T.; Oguz, H.; Kurtoglu, V.; Demet, O. Effects of polyvinylpyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.* **1998**, *39*, 452–458.
- Ouhida, I.; Pérez, J. F.; Gasa, J. Sepiolite (exal) decreases microbial colonization in the gastrointestinal tract of young broilers fed barley–wheat based diets. *Arch. Zootec.* **2000**, *49*, 501–504.
- Santurio, J. M.; Mallmann, C. A.; Rosa, A. P.; Appel, G.; Heer, A.; Dageforde, S.; Bottcher, M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *Br. Poult. Sci.* **1999**, *40*, 115–119.
- Potter, S.; Matrone, G. Effect of selenite on the toxicity of dietary methylmercury and mercuric chloride in the rat. *J. Nutr.* **1974**, *104*, 638–647.
- Pribilncova, J.; Margettova, E.; Kosucky, J.; Margetta, M. The effect of phenyl mercury on reproductive performance in laying hens. *Acta Vet. Hung.* **1996**, *44*, 377–387.
- Hansen, J. C.; Kristensen, P.; Al-Masri, S. N. Mercury/selenium interaction. *Nord. Vet-Med.* **1981**, *33*, 57–64.
- Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L.; Amyot, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1998**, *29*, 543–566.
- Frisk, P. Expressions of mercury–selenium interaction in vitro. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of medicine, Uppsala, Sweden. *Acta Univ. Uppsaliensis* **2001**, 988.
- Clarkson, T. W. The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1997**, *34*, 369–403.
- Rahman, L.; Corns, W. T.; Bryce, D. W.; Stockwell, P. B. Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **2000**, *52*, 833–843.

- (28) Graeme, K. A.; Pollack, C. V. Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *J. Emerg. Med.* **1998**, *16*, 45–56.
- (29) Parizek, J.; Ostadalova, I. The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia* **1967**, *23*, 142–143.
- (30) Watanabe, C. Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance? *Tohoku J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 71–77.
- (31) Mykkanen, H. M.; Metsaniitty, L. Selenium–mercury interaction during intestinal absorption of <sup>75</sup>Se compound in chicks. *J. Nutr.* **1987**, *117*, 1453–1458.
- (32) Imura, N.; Naganuma, A. Possible mechanism of detoxifying effect of selenium on the toxicity of mercury compounds. In *Advances in Mercury Toxicology*; Suzuki, T., Ed.; Plenum Press: New York, 1991; pp 275–288.
- (33) Parizek, J.; Benes, I.; Ostadalov, I.; Babicky, A.; Benes, J.; Lener, J. Metabolic interrelations of trace elements the effect of some inorganic and organic compounds of selenium on the metabolism of cadmium and mercury in the rat. *Physiol. Bohemoslov.* **1969**, *18*, 95–103.
- (34) Kossakowski, S.; Grosicki, A. Interaction between mercury and macro- and microelements in animals. *Pol. J. Environ. Stud.* **1996**, *5*, 5–9.
- (35) Grosicki, A.; Kowalski, B. Lead, cadmium and mercury influence on selenium fate in rats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2002**, *46*, 337–343.
- (36) Mykkanen, H. M.; Humaltoja, T. Effect of lead on the intestinal absorption of sodium selenite and selenomethionine in chicks. *Biol. Trace Elem. Res.* **1984**, *6*, 11–17.
- (37) Jensen, L. S. Modification of selenium toxicity in chicks by dietary silver and copper. *J. Nutr.* **1975**, *105*, 769–775.
- (38) Naganuma, A.; Ishii, Y.; Imura, N. Effect of administration sequence of mercury chloride and sodium selenite on their fates and toxicities in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1984**, *8*, 572–580.
- (39) Ganther, H.; Goudie, C.; Sunde, M.; Kopecky, M.; Wagner, S.; Hoekstra, W. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* **1972**, *175*, 1122–1124.
- (40) Urano, T.; Imura, N.; Naganuma, A. Inhibitory effect of selenium on biliary secretion of methylmercury in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *239*, 862–867.
- (41) Storelli, M. M.; Marcotrigian, G. O. Mercury speciation and relationship between mercury and selenium in liver of *Galeus melastomus* from the Mediterranean Sea. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *69*, 516–522.
- (42) El-Begearmi, M. M.; Sunde, M. L.; Ganther, H. E. A mutual protective effect of mercury and selenium in Japanese quail. *Poult. Sci.* **1977**, *56*, 313–322.
- (43) Sell, J. L.; Gorani, F. G. Influence of selenium on toxicity and metabolism of methylmercury in chicks and quail. *Nutr. Rep. Int.* **1976**, *14*, 439–447.
- (44) Heinz, G. H.; Hoffman, D. J. Methylmercury chloride and selenomethionine interactions on health and reproduction in mallards. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 139–145.
- (45) Johnson, S.; Pond, W. G. Inorganic vs organic Hg toxicity in growing rats: Protection by dietary Se but not Zn. *Nutr. Rep. Int.* **1974**, *9*, 135–147.
- (46) Emerick, R. J.; Palmer, I. S.; Carlson, C. W.; Nelson, R. A. Mercury–selenium interrelationships in laying hens. *Fed. Prot.* **1976**, *35*, 577.
- (47) Nielsen, J. B.; Andersen, O. The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury—effect of selenomethionine. *Toxicology* **1992**, *74*, 233–241.

---

Received for review October 19, 2004. Revised manuscript received December 22, 2004. Accepted December 23, 2004. We gratefully acknowledge financial support from FUNDISA. We thank Complutense University for its support through a predoctoral fellowship of A.C.

JF048267V

**2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE SELENIO Y SU INTERACCION CON Hg  
MEDIANTE EL USO DE CV-AFS, ICP-MS Y HPLC-ICP-MS**

A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara.

“Selenium long-term administration and its effect of mercury toxicity”

# SELENIUM LONG-TERM ADMINISTRATION AND ITS EFFECT ON MERCURY TOXICITY

## INTRODUCTION

Nowadays selenium (Se) is recognised as an essential micronutrient for animals and humans. To date, the major biological functions of selenium are attributed to its antioxidative properties, its role in the regulation of thyroid hormone metabolism and cell growth<sup>1</sup>. Although a variety of benefits of Se to human health have been reported<sup>2</sup>, Se is also considered to be a toxic element at high concentrations.

The most important sources of selenium for human beings in the diet are cereals, meat and fish. In fact, meat and fish appear to make rather stable contributions of selenium, generally around 40-50% of the total Se ingested<sup>3</sup>. It has been established that Se in food occurs in diverse chemical forms with different bioavailability. Therefore, the interest in total selenium and species content in meat samples of high consumption, as well as its bioavailability, is of special concern.

The absorption, distribution and elimination of selenium in animals and humans can be markedly affected by nutritional and environmental factors<sup>4</sup>. In fact, there is abundant evidence for protective effect of selenium against heavy metal action in the body, which, consequently, can cause a change in its metabolism. Therefore, *in vivo* interaction between dietary Se compounds (or their metabolites) and toxic metals are particularly important from a toxicological point of view.

Interaction of Se with mercury (Hg), one of the most hazardous environmental pollutants in the environment, has long been investigated, yet it is still incompletely understood<sup>5</sup>.

As reported by Parizek and Ostadalova<sup>6</sup>, and subsequently confirmed by many other researchers, simultaneous administration of selenite counteracts the negative impacts of exposure to mercury, particularly in regard to neurotoxicity, fetotoxicity and developmental toxicity<sup>7</sup>. In addition to the antagonism by selenium of the toxicity of inorganic mercury, its detoxifying effect on methylmercury (MeHg) has attracted attention of many scientists in heavy metal toxicology<sup>8</sup>.

Several researchers discussed a few possibilities of the protective role of Se against Hg toxicity, including the redistribution of Hg in the tissues<sup>9,10,11</sup>, the competition for binding sites<sup>12</sup>, and the formation of Hg-Se complexes<sup>13,14</sup>. However, there are controversial results on Se involvement in Hg detoxification, which is of prime concern to humans and animals for toxicological reasons.

Most studies have been conducted on the interactions between Hg and Se in mammals and fish systems. In marine mammals and seabirds, mercury is taken up from their diet

mainly as methylmercury is then transformed into a less toxic form, inorganic mercury, in their bodies. Hence, the large fraction of mercury stored at high concentration in the liver is inorganic Hg<sup>15</sup>. It has been suggested that selenium is involved in the protection of the organism against Hg intoxication<sup>16</sup> detoxifying MeHg by forming complexes containing the two elements at an equimolar ratio. In fact, mercuric selenide (HgSe) has been found in the liver of some species of marine mammals and seabirds. This compound is assumed to be an inert end product of the detoxification process in these marine animals.

In this work, as part of an ongoing study of Se bioaccumulation and bioaccessibility through the plant-animal-human food chain, Se quantification and speciation of feed and chicken samples and the subsequent *in vitro* enzymolysis of the sample was carried out.

In addition, in order to evaluate the possible antagonistic effect of selenium on mercury toxicity and to obtain insights into the detoxification mechanism of mercury by selenium, some experiments have been conducted in presence of inorganic mercury and MeHg.

## **EXPERIMENTAL**

### **ANIMALS, DIETS AND EXPERIMENTAL SETUP**

Seventy two, 1-day-old Hybro-G female broiler chickens were used in this study. The birds were randomly assigned, into 20 pens for treatment, each of 8 birds. All pens were bedded with a wood-shavings litter and equipped with feeders and waterers in an environmental chamber with 37.5 cm<sup>2</sup> per bird.

The chickens (during a study period of 42 days) were fed either with a common basal diet (control), formulated to contain all nutrients required, or with a diet supplemented with different compounds (Hg(II), MeHg, Se(IV)) specified in Table 1.

The diets and fresh water were offered *ad libitum*. The average drinking water consumption was 8.6 l and the food intake was approximately 4.3 kg of feed.

The chickens were weighed at 0, 21 and 42 days of age to determine gains in body weight and feed efficiency. During the experiment, temperature and humidity were registered. These conditions were in accordance with animal welfare.

The experimental design consisted of 6 different dietary treatments, in order to evaluate the effect of selenium on mercury bioaccumulation.

For evaluation of mercury, selenium and other metals bioaccumulation in the indicated cases, all birds were slaughtered after 42 days. The carcasses were manually eviscerated and the liver and kidney of each chicken were collected and stored individually at -18 °C.

## **INSTRUMENTATION**

An atomic fluorescence spectrometer (AFS, Merlin 10.023, P.S. Analytical Ltd., Orpington, Kent, UK) was used to determine the total mercury content. Mercury vapour was generated in a flow injection system using a multi-channel peristaltic pump (Gilson, Villiers-le-be, France), a six-way injection valve (Omnifit, Cambridge, UK) and a U-tube-gas-liquid separator. The separator was coupled to a dryer membrane (Perma Pure Products, Farmingdale, NJ, USA) to eliminate the moisture, and both together were used as an interface for CV-AFS.

An inductively coupled plasma mass spectrometer, (ICP-MS, HP-4500 Plus, Tokyo, Japan) fitted with a Babington nebulizer and a Scott double-pass spray chamber cooled by a Peltier system was used for total selenium determination and selenium detection after chromatographic separation. Before coupling the chromatographic system, the ICP-MS working conditions were optimised, using a standard solution containing elements spanning the mass range from beryllium to uranium, at a  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  level.

The chromatographic system used consisted of a PU-2089 HPLC pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a six-port sample injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a  $100 \mu\text{L}$  injection loop was used for chromatographic experiments. Selenium speciation was performed in a Hamilton PRP-X200 ( $10 \mu\text{m}$ ,  $250 \text{ mm} \times 4.1 \text{ mm i.d.}$ ) (Reno, NV, USA) cation exchange column.

The chromatographic system was coupled to the ICP-MS by a 5 cm polytetrafluoroethylene capillary tubing ( $0.5 \text{ mm i.d.}$ ) running from the column outlet to the Babington nebuliser inlet.

10 kDa cut-off filters (Millipore, MA) and an Eppendorf (Hamburg, Germany) Centrifuge 5804, F34-6-38 were used as a clean-up method.

For total Hg and Se determination, samples were microwave digested in double-walled advanced composite vessels using a 1000 W Microwave Sample Preparation System (MSP) microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA).

## **REAGENTS**

Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenite and sodium selenate (Merck, Darmstadt, Germany) in deionised Milli-Q water ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtained from a Millipore Milli-Q water purification system (Millipore, Ohio, USA). Selenoaminoacids (SeCys<sub>2</sub> and SeMet) were purchased from Sigma and dissolved in 3% (v/v) HCl and deionised Milli-Q water (Millipore), respectively. Stock solutions of  $10 \text{ mg l}^{-1}$  were stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$  and working standard solutions were prepared daily by dilution.

For HPLC–ICP-MS studies, the mobile phase was 4mM pyridine (Merck) formate in 3% methanol (SDS, Barcelona, Spain). For the enzymatic hydrolysis procedure, Tris–HCl and the non-specific protease *Streptomyces griseus* (Pronase E) (Merck) were used to prepare the chicken tissue samples.

Enzymes and bile salts were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): pepsin (Porcine; catalogue no. P-7000), pancreatin (Porcine; catalogue no. P-1750), and bile salts (catalogue no. B-8756).  $\alpha$ -Amylase was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) (catalogue no.1329).

Mercury standards solutions were prepared by appropriate dilution of a stock mercury chloride solution (1000 mg Hg(II) L<sup>-1</sup>) (Merck, Darmstadt, Germany) and methylmercury chloride (1000 mg MeHg L<sup>-1</sup>) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in deionised Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA). These solutions were stored in amber vials at –18 °C. Standards were prepared daily to reduce mercury losses by volatilization.

Stannous chloride (3% w v<sup>-1</sup>), used as a reducing agent for Hg(II) in CV-AFS, was prepared by dissolving the appropriate mass of stannous chloride, anhydrous, (Merck, Darmstadt, Germany) in 3M hydrochloric acid that had been prepared by diluting 12 M hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany) with ultra- pure water.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) were used for acid digestion of samples.

Argon (purity 99.999 %, Carburros Metálicos, Spain) was used as a make up gas, sheath gas at the transfer line and as carrier gas with AFS, respectively.

## MEASUREMENTS

### *Total selenium quantification*

To determine the total selenium content, the dry samples (50-200 mg) were digested with 1-2 mL of concentrated nitric acid and 0.5 mL of 35% hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 43% power output. The pressure was held at 20 psi for 15 min, at 40 psi for 30 min and finally at 85 psi for 1 hour.

The total selenium concentration was determined by ICP-MS. For this purpose, the isotopes <sup>78</sup>Se and <sup>82</sup>Se were monitored. <sup>103</sup>Rh was used as an internal standard. Total selenium concentration was determined by both, external and standard addition calibrations of the signal obtained by ICP-MS.

### ***Selenium speciation***

Portions of 150 mg of the dry samples were enzymatically hydrolyzed following a previously developed method<sup>17</sup>. The extracts obtained were processed through 10 kDa mass cut-off filters, diluted to 10 mL and analysed by cation exchange chromatography coupled to ICP-MS, under the operating conditions given in Table 2.

The analytical peaks were evaluated in terms of peak area by a standard addition calibration method at m/z 78 and 82.

### ***In vitro gastrointestinal digestion method***

The in vitro digestion method used was based on that described by Lutén et al.<sup>18</sup>, modified and adapted for the chicken being studied. About 50 g of sample were placed in a 250 mL Erlenmeyer flask with 150 mL of gastric juice (6% w v<sup>-1</sup> pepsin in 0.15M NaCl, acidified with HCl to pH 1.8) and shaken for 1 min for initial degassing. The mixtures were then held in a thermostatic water bath for 4 h at 37 °C, shaking periodically.

After 1 h the pH was checked and adjusted to 3 with 6M hydrochloric acid. After gastric digestion, saturated sodium bicarbonate was added to raise the pH to 6.8. Then 100 mL of intestinal juice (1.5%, w v<sup>-1</sup> pancreatin, 0.5%, w v<sup>-1</sup> amylase and 0.15%, w v<sup>-1</sup> bile salts, in 0.15M NaCl) were added and the mixture was energetically shaken for 1 min and left in a thermostatic water bath for 4 h at 37 °C, shaking periodically. Once gastric/ gastrointestinal digestion was completed, a 10 mL aliquot of the suspension was transferred to a polypropylene tube and centrifuged at 1575×g for 1 h. The supernatant was filtered through a 0.45 µm Millipore filter, to reduce any effect from microbial activity and both supernatants and precipitates were stored in the dark at 4 °C until analysis. Gastric and intestinal digestion blanks were obtained by adding 150 mL of gastric juice to 50 mL of Milli-Q water and 100 mL of intestinal juice respectively, and the above procedure was applied.

### ***Total mercury quantification***

The samples followed the same acid digestion as mentioned for total selenium quantification.

Total mercury concentration was determined by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by the continuous mercury cold vapour system connected to AFS equipment. A flow rate of 2.5 mL min<sup>-1</sup> (3M hydrochloric acid) and a



similar flow rate of the reductant solution (3% stannous chloride in 3M hydrochloric acid) were used to generate the mercury cold vapour.

### ***Mercury speciation***

Mercury leaching was performed following an acid leaching procedure developed previously<sup>19</sup>.

Afterwards, the total organomercury content in the supernatants was determined by difference between total mercury content (after digestion with HNO<sub>3</sub>) and inorganic mercury content by using stannous chloride as a selective reductant.

### ***Validation of the results***

In the present work, two certified reference materials were employed for validation of the methodologies used. Method validation for mercury was performed by using the reference material CRM-463 (tuna fish), certified for methylmercury ( $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ ), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR), while for total selenium a marine tissue reference material (Murst-ISS A2), certified for total selenium ( $7.37 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$ ) from Institute for Reference Materials and Measurements was used.

## **RESULTS AND DISCUSION**

### **EVALUATION ON Se BIOACCUMULATION**

In an attempt to improve our understanding of the transfer process of selenium along the trophic chain, the uptake of selenium in chickens from feed was evaluated.

During the assays chickens were fed animal feed of vegetal origin. In order to asses selenium uptake, total selenium content of the chickens feed and chicken tissues (liver, kidney and muscle) as well as its speciation was carried out by ICP-MS and LC-ICP-MS, respectively.

The mean selenium concentration in chicken ranged from  $0.23 \text{ mg g}^{-1}$  in muscle to  $1.6 \text{ mg g}^{-1}$  in kidney, being the skeletal muscle the largest body pool of Se (Table 3).

The enzymatic digestion specified in the procedure section followed by ultrafiltration with 10 kDa cut-off filters was applied to the chicken feed and chicken samples in order to identify and quantify the seleno-amino acids and inorganic Se species.

For chicken feed no selenium losses were detected in this step (Se recoveries 93-97%), which indicates that the molecular weight of most of the selenium species extracted during the hydrolysis was lower than 10 kDa. On the other hand, selenium recoveries for chicken tissues were not quantitative, so during the enzymatic hydrolysis of proteins, some selenium remained in peptide form.

The analysis was carried out by cation exchange chromatography. The identification and quantification were performed by the standard addition method using two different chromatographic conditions. A standard chromatogram at each pH value and the chromatogram obtained after enzymatic hydrolysis are shown in Fig 1 and 2.

Two peaks could be differentiated in all the samples. The first peak was unidentified, it could not be attributed to any of the selenium species tested. The second peak was identified as SeMet, the only seleno-amino acid found in all samples. The identification of the peaks was carried out by the spiking procedure. The same chromatographic profiles were obtained by the two chromatographic methods used (at pH 2.8 and 4.7).

The results from the speciation analyses of the samples are shown in Table 3. The amount of SeMet varied depending on the type of sample.

In the chicken feed the main selenium-species found was SeMet (90% of total Se). Therefore we can conclude that the chemical form of Se consumed by the animals used in this study was mostly SeMet.

According to the literature, plants such as cereals and forage crops convert Se predominantly into SeMet<sup>20</sup> and incorporate it into protein in place of methionine<sup>21</sup>. Therefore, in nature animals receive Se mainly in the form of selenomethionine. Taking into account that the main components of the feed were: corn, wheat and soybeans, the value found is comparable with other SeMet data found in this type of cereal. Intake of dietary SeMet is reflected in the SeMet content of the chicken. SeMet is incorporated into tissue proteins especially in the skeletal muscles (96%) and the liver, according to yet published data<sup>20,21,22</sup>.

Each chicken consumed approximately 4.3 kg of feed throughout the feeding period. Therefore, 3.24 µg of total Se and 2.94 µg of SeMet were ingested.

Assuming that 55.6% of carcass weight is muscle, 2.3% is liver and 0.7% is kidney and Se is evenly distributed throughout these tissues, 365 µg of total Se and 168 µg of total SeMet were bioaccumulated in the chickens analyzed. Therefore, this experimental animal study showed that 12% and 5.6% of the ingested Se was accumulated in the evaluated tissues as total Se and as SeMet, respectively. It was also noted that the greatest body store of Se

and SeMet in chicken was the muscle, being kidney and the liver the target organ of total Se and SeMet, respectively.

Since higher animals are unable to synthesise SeMet, any detectable amount in the organs and tissues must arise only from dietary sources. As a result, SeMet is incorporated into chicken tissue proteins in place of Met. This allows Se to be stored in the organism and reversibly released by normal metabolic processes, thus offering an advantage over other Se compounds. Any SeMet that is not immediately metabolised is incorporated into organs with high rates of protein synthesis such as the skeletal muscles, liver, kidney.

## **SELENIUM BIOACCESSIBILITY**

The role of Se in human nutrition is an important topic of recent research and it is well recognised that adequate dietary Se is an important determinant of human health<sup>23</sup>. In some countries (e.g. the USA) 50% of the total Se in the typical diet is provided by beef, white bread, pork, chicken and eggs. This means that poultry products are among the major Se sources for humans<sup>24</sup>.

Se status relies on the dietary selenium intake and the element bioavailability. Therefore, total selenium and species determination in chicken meat (muscle) is of special concern because of its high consumption and its important contribution to the Se status of humans. Unfortunately the total concentration of Se in food does not provide information about its bioavailability. The extent of the toxic or beneficial effects caused by Se is not governed by their total concentration, but rather regulated by the forms of the metal that can efficiently interact with sites on the biological ligands<sup>25</sup>. Consequently, total determination and speciation of Se in the gastrointestinal tract is essential to understand and predict its availability for absorption<sup>26</sup>.

In order to study Se bioaccessibility from human diet an *in vitro* enzymolysis simulating the human gastrointestinal digestion was carried out.

The recoveries of endogenous Se from chicken muscle in the gastric supernatant (pH 2.0) did not differ significantly ( $P < 0.05$ ) from the gastrointestinal supernatant (pH 6.8).  $43 \pm 3\%$  and  $40 \pm 5\%$  of total Se was found bioaccessible in the simulated stomach and intestinal digestion, respectively.

The percentage of ultrafilterable ( $< 10$  kDa) selenium (23% of total Se) following simulated gastrointestinal digestion of chicken muscle showed an important decrease in the bioaccessible fraction, which means that the *in vitro* digestion was not completely effective in breaking down the peptides or proteins in smaller fractions, so some selenium may have remained in peptide form.

A mass balance was performed after application of the in vitro digestion method. Both the soluble fraction and non-soluble fraction resulting from application of the in vitro digestion method were analysed. The mass balance result for se was  $96 \pm 8\%$ .

In order to evaluate whether the in vitro digestion method employed keeps the integrity of the selenium species present in the initial product, or brings some transformation, selenium speciation of the gastrointestinal extracts was carried out.

The identification of the peaks was carried out by the spiking procedure. The first peak was unidentified and could not be attributed to any anionic selenium species tested. SeMet was found (second peak) to be the dominant Se species, being the only seleno-amino acid found in both extracts (gastric and gastrointestinal). The chromatographic profiles obtained by the two chromatographic methods used were the same.

The results of speciation analysis of the gastrointestinal digestion extract shows that 21% of the bioaccessible Se was found as SeMet.

Although chickens have no efficient mechanism for Met synthesis, and consequently are unable to synthesise SeMet, are a source of SeMet due to its diet and the plant-animal food chain.

#### **EFFECT OF MERCURY LONG-TERM ADMINISTRATION ON SELENIUM SPECIATION**

We have previously reported the effect of Hg on natural occurring levels of Se<sup>27</sup>, however no speciation studies have been reported.

In order to evaluate the effect of Hg (inorganic and organic) on selenium metabolism the speciation of several chicken tissues (kidney, liver and muscle) has been carried out. Se speciation of the chicken tissues revealed the same chromatographic profiles. The first peak was unidentified and the second one was identified as SeMet. Furthermore, the addition of Hg(II) or MeHg to the control diet did not change the SeMet distribution (Fig. 3). Therefore, Hg exposure did not significantly alter SeMet uptake.

#### **EFFECT OF SELENIUM LONG-TERM ADMINISTRATION ON MERCURY TOXICITY**

In order to understand the molecular basis of the Hg-Se antagonistic mechanism involved in the accumulation process of mercury in chicken, we designed a feeding experiment to test the effect of dietary selenite on dietary mercury poisoning. Since we were also interested in the molecular specificity of the mercury-selenium interaction, mercury was fed in two forms, mercuric chloride and methylmercury chloride.

In order to assess mercury uptake, total mercury content of the chicken tissues (liver, kidney and muscle) as well as its speciation was carried out by CV-AFS.

The mean mercury concentration in chicken ranged from  $0.006 \mu\text{g g}^{-1}$  in muscle to  $0.304 \mu\text{g g}^{-1}$  in liver (Table 4), being the muscle the largest body pool of mercury.

As it has been previously reported the addition of Se to a Hg(II) containing diet significantly alleviated the adverse accumulation of Hg in chicken. However, the addition of Se to the MeHg containing diet did not affect the mercury accumulation in kidney, but Hg concentration liver and muscle was highly affected by se administration.

As a consequence mercury speciation has been carried out to clarify whether Se enhances MeHg accumulation or MeHg conversion into less toxic forms.

The determination of inorganic and total mercury determination was achieved by selective reduction with  $\text{SnCl}_2$  and later measurement by CV-AFS.

The results (Table 4) show that inorganic mercury does not undergo a biotransformation process because it remains unalterable as inorganic mercury. However, some of the MeHg which enters the body is partly demethylated to inorganic mercury (a less toxic form). It seems likely that most of this demethylation process takes place in the liver, with subsequent accumulation of Hg(II) in the kidneys<sup>28</sup>. In fact, according to the literature a large fraction of mercury stored at high concentration in the liver of some animals (marine mammals and seabirds) is found as Hg(II) despite the fact that mercury is take up from their diet mainly as methylmercury performing a toxicologically less damaging alternative to the accumulation of MeHg.

On the other hand, some authors suggest that Se is directly involved in the demethylation process.

In our case, the addition of Se to the MeHg-containing diet meant promotion of MeHg conversion into a less toxic form (inorganic Hg), because an increase up to 145-280% of MeHg demethylation in chicken liver and kidneys was observed. It has been previously suggested that the process of demethylation of MeHg and inorganic mercury transformation by reaction with selenium to form mercuric selenide would be an effective mechanism for counteracting the potentially damaging action of mercury<sup>29</sup>. Se, in addition to its role as micronutrient, exerts an antidotal action on the toxic effects of mercury, through the formation of highly insoluble complexes, consisting of mercury selenide  $\text{HgSe}$ . This compound is assumed to be an inert and product of the detoxification process in marine animals<sup>30</sup>.

In conclusion, liver is the main site of MeHg biotransformation in chickens. Furthermore, an antagonic effect of Se favouring MeHg detoxification pathway involving the liver is proposed.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> Patching S.G., Gardiner P.H.E., *J. Trace Elem Med. Biol.*, 1999, 13, 193-197.
- <sup>2</sup> Díaz Huerta V., Szpnar J., Lobinski R., Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 1471.
- <sup>3</sup> Combs G.F. *The role of selenium in nutrition*, 1986. Combs S.B. (eds). Academic, New York.
- <sup>4</sup> Grosicki A., Kowalski B., *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2002, 46, 337.
- <sup>5</sup> Watanabe C., *Tohoku J. Exp. Med.*, 2002, 196, 71.
- <sup>6</sup> Parizek J., Ostadalova I., *Experientia*, 1967, 23, 142.
- <sup>7</sup> Raymond L.J., Ralston N.V.C., *Seychelles Medical and Dental Journal*, 2004, 7, 1.
- <sup>8</sup> Imura N., Naganuma A., *Advances in Mercury Toxicology*, 1991, pp. 275-288. Suzuki T. (Ed) Plenum Press, New York.
- <sup>9</sup> Fang S.C., *Chem. Biol. Interact.*, 1977, 17, 25.
- <sup>10</sup> Sheline J., Schimdt-Nielsen B., *Physiological Responses of Marine Biota to Pollutants: Methylmercury-selenium Interaction in killifish, Fundulus heteroclitus*, 1975, pp 119-130. Vernberg F. (Ed). Symposium, Milford, CN.
- <sup>11</sup> Chen R.W., Whanger P.D., Fang S.C., *Pharmacol. Res. Commun.*, 1974, 6, 571.
- <sup>12</sup> Leonzio C., Focardi S., Bacci E., *Sci. Total. Environ.*, 1982, 24, 249.
- <sup>13</sup> Yoneda S., Suzuki K.T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, 143, 274.
- <sup>14</sup> Naganuma A., Imura N., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1980, 27, 163.
- <sup>15</sup> Ikemoto T., Kunito T., Tanaka H., Baba N., Miyazaki N., Tanabe S., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2004, 47, 402.
- <sup>16</sup> Koeman J.H., Peeters W.H.M., Koudstaal-Hol C.H.M., Tjioe P.S., Degoeij J.J.M., *Nature*, 1973, 245, 385.
- <sup>17</sup> Cabañero A.I., Madrid Y., Cámara C., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 373.
- <sup>18</sup> Luten J.B., Bouquet W., Burggraaf M., Rus J., *Trace Elements: Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, 1987 p. 509., Bratter P., Schramel P. (Eds.). Galter de Gruter, New York.
- <sup>19</sup> Cabañero A.I., Madrid Y., Cámara C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 1595.
- <sup>20</sup> Schrauzer G.N., *Adv. Food. Nutr. Res.*, 2003, 47, 73.
- <sup>21</sup> Schrauzer G.N., *J. Nutr.*, 2000, 130, 1653.
- <sup>22</sup> Daniels L.A., *Biol, Trace Elem. Res.*, 1996, 54, 185.
- <sup>23</sup> Rayman M.P. *Lancet*, 2000, 356, 233.
- <sup>24</sup> Surai P.F., *World's Poultry Sci. J.*, 2002, 58, 431.
- <sup>25</sup> Asean A., Vasconcelos M., *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38, 899.
- <sup>26</sup> Hocquellet P., L'hotellier M., *J. AOAC Int.*, 1997, 80, 920.
- <sup>27</sup> Cabañero A.I., Madrid Y., Cámara C., *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 2125.

---

<sup>28</sup> Frisk, P. Expressions of mercury-selenium interaction in vitro. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of medicine, Uppsala, Sweden. Acta UniV. Uppsaliensis. 2001, 988.

<sup>29</sup> Storelli M.M., Marcotrigiano G.O., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2002, 69, 516.

<sup>30</sup> Martoja R., Berry J.P., *Vie Milieu Paris*, 1980, 30, 7.

**3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN MERCURIO-SELENIO EN HÍGADO DE POLLO  
MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR  
ACOPLADA AL ICP-MS**

A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara.

“Study of mercury-selenium interaction in chicken liver by size exclusion chromatography  
inductively coupled plasma-mass spectrometry”

***J. Anal. At. Spectrom.***, (aceptado)

El trabajo completo se presentó como poster en “European Winter Conference on Plasma  
Spectrochemistry”. Budapest, Hungría. 1-4 Febrero 2005.



# STUDY OF MERCURY-SELENIUM INTERACTION IN CHICKEN LIVER BY SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-MASS SPECTROMETRY

Ana I. Cabañero, Yolanda Madrid and Carmen Cámara\*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

\* E-mail: ccamara@quim.ucm.es

## ABSTRACT

In order to estimate metal distribution patterns in biomolecules of different sizes and their possible modification after long-term Hg and Se exposition, multi-elemental distribution of the cytosols of chicken livers were evaluated. For this purpose 72 chickens were fed under different controlled conditions. Chickens were exposed to Hg(II) and MeHg added to feed with or without selenium supplementation.

Size-exclusion chromatography with ICP-MS detection was developed for multielemental (S, P, Cu, Zn, Se, Mn, Fe and Hg) speciation in chicken liver cytosol and optimisation of the separation parameters (25 mM Tris-HCl buffer, 50 mM KCl, pH 6.8, 1ml min<sup>-1</sup>) was carried out.

The liver extracts were injected into the column four times each and the variation between the runs was small (RSD<10%). The recovery of the chromatographic step varied between 82-102%, indicating some interaction between the liver extracts and the column material.

S, Cu, Zn, Fe, Se and Hg appeared mainly associated to high and medium-molecular weight species (>300-45 kDa), whereas Mn is mainly associated to high (116 kDa) and (0.03kDa) low molecular weight species and P is mainly associated to low molecular weight species (5.5 kDa).

Changes in the subcellular distribution and distribution patterns caused by long-term Hg-Se administration have been discussed.

## INTRODUCTION

Mercury is a widely distributed and persistent pollutant in the environment and is among the most highly bioconcentrated trace metals in the human food chain. Mercury toxicity, bioavailability and environmental mobility are well known to be highly dependent on its chemical form<sup>1</sup>, being methylmercury one of the most toxic species. Therefore, risk assessment and risk prevention of human exposure to mercury is a milestone in food safety.

Selenium is known to be both an essential and toxic micronutrient for living organisms, whose biological functions are believed to be carried out by selenoproteins, in which Se is specifically incorporated as the amino acid selenocysteine. In addition, Se also occurs as selenomethionine, which can be non-specifically incorporated into proteins instead of methionine<sup>2</sup>.

Nowadays, the major functions of this element are attributed to its antioxidant properties and its role in the regulation of thyroid hormone metabolism and cell growth<sup>2</sup>. Moreover, several authors reported a protective function of Se against toxic effects caused by mercury, but the way in which it interferes with mercury has not yet been fully elucidated<sup>3-7</sup>.

Negative and positive effects of these elements on organisms are significantly dependent on the speciation, concentration, metabolism and path of exposure. In addition to that, the general trace element status of an exposed organism has also to be considered because interactions between absorbed elements species and already present metal complexes may modify its metabolism, multiplying or reducing the biochemical effects<sup>8</sup>. In fact, the imbalances of essential elements caused by heavy metals could often induce dysfunction damage to organs and tissues<sup>9</sup>.

Trace elements play very important roles in living organisms<sup>10</sup>. More than a third of cellular proteins have a functional requirement for at least one catalytic or structural metal ion cofactor<sup>11-12</sup>. In addition to proteins that employ the metals there are a variety of metal-binding proteins that import, export, and transport metals within the cell, assemble metalcenters, detoxify the cytoplasm, and regulate expressions of the various protein factors<sup>12-16</sup>.

The characterisation of trace element species in solid biomatrices like liver is necessary to obtain a more detailed knowledge of the complex function and interactions of these compounds in the organism<sup>8</sup>. Therefore, to elucidate the mechanisms that control the uptake of mercury and selenium by an organism exposed to these metals as well as metal transport, metabolism and detoxification processes, reliable information is needed not only about these elements but also about trace-element speciation of biomolecules with specific

functions in the cell. Consequently, multielement detection is necessary to study those effects in complex biomatrices.

Metal-protein interactions sometimes are labile under standard analytical conditions employed for chromatography or mass spectrometry, thus investigation of metal-containing proteins requires particular attention to assure that their native composition is retained<sup>17</sup>. Size-exclusion chromatography (SEC) is especially suitable for separation of element species of limited stability being frequently encountered in protein-rich matrices. The main advantages of SEC are simplicity of application, compatibility of mobile phase composition with specific demands of certain biological sample and possibility of estimation of molecular mass of element species<sup>18</sup>.

Therefore SEC is often applied as the method of choice for separation of the fraction containing metallobiomolecules of interest. SEC with element-specific detection like ICP-MS allows the estimation of the molecular weight of biomolecules in non-denaturing condition<sup>19</sup>, and was successfully applied, to element species fractionation in animal tissues<sup>8, 20-23</sup>, food<sup>24-26</sup>, plants<sup>18, 27-31</sup>, and human cells<sup>32</sup>.

The aim of this work is the application of SEC-UV and SEC-ICP-MS to investigate the binding patterns of many trace elements in chicken liver estimating the molecular weight of the water-soluble compounds. The distribution of metalloproteins and their element binding pattern obtained in this way are also compared with those obtained from chicken supplemented with Hg(II), MeHg and Se in an attempt to investigate the mercury-selenium-trace elements interaction. To elucidate the complexities of mercury and selenium the changes in the element binding pattern are also evaluated.

The investigation on the differences of the distribution of Hg, Se and essential elements might be helpful to the understanding of the mechanism of mercury toxicity.

## **EXPERIMENTAL**

### **Instrumentation**

An inductively coupled plasma mass spectrometer, (ICP-MS, HP-4500 Plus, Tokyo, Japan) fitted with a Babington nebuliser and a Scott double-pass spray chamber cooled by a Peltier element system was used for total metal determination and metal detection after chromatographic separation. Before coupling the chromatographic system, the ICP-MS working conditions were optimised, using a calibrant, byspanning the mass range from beryllium to uranium, at a  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  level.

A spectrometer 5000 photodiode array detector (LDC Analytical Thermo Separation Product, Uxbridge, Middlesex, UK) was used for total protein determination and protein detection after chromatographic separation.

A PU-2089 HPLC pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a six-port sample injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a 200  $\mu$ L injection loop was used for chromatographic experiments. Protein separations were carried out in a Biosep-SEC-2000 (10  $\mu$ m, 300 x 7.8 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) size exclusion column, with an effective separation range of 300-1 kDa.

The chromatographic system was coupled to the spectrometer or ICP-MS by a 5 cm polytetrafluoroethylene capillary tubing (0.5 mm i.d.) running from the column outlet to the spectrometer or Babington nebuliser inlet for online measurements.

An Eppendorf (Hamburg, Germany) Centrifuge 5804, F34-6-38 was used for the separation of the supernatant after protein extraction from liver tissues.

For total trace element determination, samples were microwave digested in double-walled advanced composite vessels using a 1000W MSP (Microwave Sample Preparation system) microwave oven (CEM, Mattheus, NC, USA).

0.22  $\mu$ m Millipore nylon filters were used to filter the HPLC solutions and 0.22  $\mu$ m Millipore Millex-HV filters were used to filter the samples before the injection into the SEC column.

## Reagents

All reagents were of analytical-reagent grade and were used without further purification.

Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenite (Merck, Darmstadt, Germany) in ultrapure water (18.2 M $\Omega$  cm) obtained from a Millipore Milli-Q water purification system (Millipore, Ohio, USA). Selenoaminoacid (selenomethionine) was purchased from Sigma and dissolved in 3% (v/v) HCl and deionised Milli-Q water (Millipore). Stock standard solutions of 10 mg l<sup>-1</sup> were stored in the dark at 4°C and working standard solutions were prepared daily by dilution.

Mercury standards solutions were prepared by appropriate dilution of a stock mercury chloride solution (1000 mg Hg(II) l<sup>-1</sup>) (Merck, Darmstadt, Germany) and methylmercury chloride (1000 mg MeHg l<sup>-1</sup>) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in deionised Milli-Q water (Millipore, Ohio, USA). These solutions were stored in amber vials at -18 °C. Standards were prepared daily to reduce mercury losses by volatilization.

Standard metal solutions of 1000 mg l<sup>-1</sup> from Merck (Darmstadt, Germany) were used. All working solutions were prepared daily with deionised Milli-Q water (Millipore).

Proteins (blue dextran 2000; alcohol dehydrogenase; cytochrome C and aprotinin) and metal-binding proteins (carbonic anhydrase; albumin from bovine serum and coenzyme

B12) for calibrating the size exclusion chromatographic column were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

A protease inhibitor cocktail (104mM AEBSF, 0.08 mM Aprotinin, 2 mM Leupepetin, 4 mM Bestatin, 1.5 mM Pepstatin A and 1.4 mM E-65) to improve the yield of intact proteins, was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Tris [Tris(hydroxymethyl)-aminomethane], KCl and HCl, used in the preparation of the mobile phase (pH: 6.8 25 mM Tris-50 mM KCl), the extraction buffer (pH: 6.8 25 mM Tris-50 mM KCl) and the protein standards (pH: 7.5 100 mM Tris-50 mM KCl), were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Coomassie Brilliant Blue G-250 was used for total protein determination.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) from Panreac and HNO<sub>3</sub> (65%) pro analysis grade (distilled in our laboratory in a distillation system for acids, model BSB 939IR from Berghof (Eningen Germany) were used to digest the samples.

## **PROCEDURES**

### ***Animals, diets and experimental setup***

Seventy two, 1-day-old Hybro-G female broiler chickens were used in this study. The birds were randomly assigned, into 10 pens for treatment, each of 8 birds. All pens were bedded with a wood-shavings litter and equipped with feeders and waterers in an environmental chamber with 37.5 cm<sup>2</sup> per bird.

The chickens (during a study period of 42 days) were fed either with a common basal diet (control), formulated to contain all nutrients required, or with a diet supplemented with different compounds (Hg(II), MeHg, Se(IV)) specified in Table 1.

The experimental design consisted of 6 different dietary treatments, in order to evaluate the effect of selenium on mercury bioaccumulation.

For evaluation of mercury, selenium and other metals bioaccumulation in the indicated cases, all birds were slaughtered after 42 days. The carcasses were manually eviscerated and the liver of each chicken was collected and stored individually at -20 °C.

## **MEASUREMENTS**

### ***Total element quantification***

To determine the total content, the fresh samples (1 g) were digested with 4 mL of nitric acid and 1 mL of 35% hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 43% power

output. The pressure was held at 137,895 Pa for 15 min, at 275,790 Pa for 30 min and finally at 586,053 Pa for 1 hour.

The element recovery obtained after Tris-HCl extraction was calculated on the basis of the total element concentration found in the digested liver (using HNO<sub>3</sub>). The insoluble pellet was then digested using concentrated HNO<sub>3</sub> for a complete recovery.

The total contents as well as the extractable amounts of elements and pellets were analysed by ICP-MS.

All metals were quantified by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by the ICP-MS using the operating conditions given in Table 2.

## **Metal compounds determination**

### ***Size exclusion chromatography (SEC)***

As previously detailed, the chromatographic separation was performed with a Biosep-SEC-2000 column.

The following peptides and proteins of molecular weights from 0.198 to 150 kDa were used for determination of molecular weights: blue dextran (2000 kDa); alcohol dehydrogenase (150 kDa); albumin from bovine serum (66 kDa); carbonic anhydrase (29 kDa); cytochrome C (12.4 kDa); aprotinin (6.5kDa); coenzyme B12 (1.579 kDa) and selenomethionine (0.198 kDa). Approximately 1000 mg l<sup>-1</sup> solutions of each protein standard were prepared in 50 mM Tris-HCl/100 mM KCl at pH=7.5. Diluted solutions of 20-100 mg l<sup>-1</sup> were prepared daily in deionised water.

The calibration curve for the size exclusion column was determined both by UV (at 250 and 280 nm) and ICP-MS (monitoring <sup>59</sup>Co, <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>64</sup>Zn, <sup>66</sup>Zn, <sup>78</sup>Se and <sup>82</sup>Se isotopes), by plotting log (molecular weight) versus the retention time.

The column was regularly washed according to the recommendations of the manufacturer to remove adsorbed material.

### ***Speciation analysis of protein-bound elements in cytosol samples***

Liver tissue was homogenised in a Tris buffer (25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7.5) and 50 µl of the protease inhibitor cocktail to yield a 20% (m/v) homogenate, using a Potter homogeniser. Cell disruption was performed at a cold temperature (4°C) by keeping the sample on ice.

The soluble components were thereafter separated by centrifugation for 30 min at 15000 g at 4°C, to minimise the risk of species degradation or transformation. After centrifugation the supernatant was decanted and filtered through a 0.22 mm filter and stored at -20°C until analysis. The metallocompounds in the supernatant were fractionated with size-exclusion chromatography-ICP-MS. Prior to SEC-ICP-MS analysis, the supernatant was diluted 5-fold. The pellet was mineralised and then also measured for its total content in Cr, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd, Fe, Mn and Hg by ICP-MS.

### ***Determination of proteins analysis***

The protein content in soluble fractions was determined spectrophotometrically ( $\lambda=595\text{nm}$ ) by the Bradford method with Coomassie Brilliant Blue G-250. Bovine serum albumin was used as the calibration standard.

### ***Validation of the results***

In the present work, two certified reference materials were employed for validation of total metal content and species. Method validation for mercury was performed by using the reference material CRM-463 (tuna fish), certified for methylmercury ( $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ ), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR) whereas for total Cr, Mn, Co, Cu, Cd, Zn, Se a certified marine tissue reference material, CRM 278R (mussel tissue), currently available as a European Reference Material ERM CE278, was used.

### ***Statistical analysis***

A one-factor analysis of variance was applied to detect possible differences in total elements between the different treatments studied. A significance level of  $p<0.05$  was adopted for all comparisons. Statgraphics Plus version 4.0 (Statistical Graphics) was used for the statistical analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

### ***a) Total element concentration and distribution***

Total element content of the chicken liver was determined by ICP-MS after a microwave digestion (Table 3). The results were obtained using external calibration and the accuracy of the method was evaluated by analysing different certified biological reference materials. Since no significant differences were observed ( $p < 0.05$ ) between the certified values and the experimental ones, the method used was adequate for total determinations in the sample analysed.

In addition, the quantitative distribution of metals between the Tris-HCl-soluble and non-soluble fractions of liver was investigated in order to evaluate the element distributions and the element extraction efficiency of the proposed method.

The results for 10 elements are given in Table 3, from which it can be seen that the major elements are Fe, Zn, Cu and Cr (essential elements). The minor elements are Co, As and Cd, being the latter toxic elements. For Hg the concentration was below the detection limit of the procedure used, therefore, the basal diet control group did not show evidence of Hg contamination.

The calculated extraction efficiency expressed as per cent of soluble metal relative to total metal in the liver is also given in Table 3. With a Tris-HCl buffer 32 to 70% of the metal content was extracted. The results showed some differences in extraction efficiency, depending on the element, being higher (>65%) for Co, Zn and As. Mn, Cu, Cd and Fe were nearly equally distributed between the cytosolic fraction and the pellet, whereas the major amount of Cr and Se was probably not located in the cytosol but for example bound to membranes or nuclei and therefore, not extracted with the applied procedure.

### ***b) Optimization of SEC separation***

Several parameters that could influence the efficiency of the SEC protein separation such as mobile phase pH, salt concentration and flow rate were optimised for the SEC column using UV detection. Phosphate and Tris-HCl buffer solutions within the 10 to 50 mM concentration range were tested. The use of 25 mM Tris-HCl buffer results in better resolution, hence the use of this buffered solution was proposed.

The effect of salt concentration on protein separation efficiency was evaluated for the SEC column by the addition of 25 to 100 mM KCl to the Tris-HCl buffer. The highest resolution was achieved using 50 mM. Therefore, the separations were carried out with 50 mM KCl.

The pH range was slightly modified close to pH=7 (6.5-7.5), and the best results were obtained at pH=6.8.



The effect of the mobile phase flow rate was evaluated from 0.6 to 1.0 ml min<sup>-1</sup> to enable subsequent hyphenation of the SEC column to the ICP-MS. As no significant changes in resolution were observed, the highest flow rate (1.0 ml min<sup>-1</sup>) was chosen for further experiments.

After optimising the chromatographic parameters, the columns were calibrated with proteins of different molecular weight. Relative standard deviations (n=5) for the elution volumes measured were lower than 2%. The equation obtained for the calibration was:  $\log(\text{MW}) = -0.4773 t_r + 5.5112$  and the correlation coefficient (r) was 0.998, which was considered suitable for column calibration.

### ***c) Element binding pattern in control liver cytosol***

In order to estimate metal distribution patterns in biomolecules of different sizes, the cytosol isolated from the control liver homogenate was injected into the SEC column. Soluble proteins and multi-elemental distributions were assessed by comparing the chromatograms obtained by both UV (at 280 and 250 nm) and ICP-MS.

Each sample was injected 4 times and the variations between runs were small (RSD: 3-7%). The recovery of the metals in the chromatographic step varied between 82-102% depending on the element. Thus, there seems to be some interaction between some elements (Cu and Mn) and the column material.

### **UV profiles**

The protein profiles are shown in Fig. 1. There were 10 UV peaks easily distinguishable. Approximately 60% of proteins extracted from chicken liver were found in the high-medium molecular weight region (>300-45 kDa), while the remaining proteins were detected in the low molecular weight region.

The first peak corresponded to high-molecular weight proteins (>300 kDa). The second one (200 kDa) was accompanied by one small shoulder whose apparent relative molecular weight was 100 kDa. The third peak (major peak) corresponded to medium-molecular weight species (45 kDa).

The following two peaks corresponded to low molecular weight (4, 1 kDa) species.

UV peaks at retention times above 12 min represent compounds with a molecular weight estimated out of optimum fractionation range given by the manufacturer and may be separated by mechanisms other than size-exclusions (e.g. adsorption)<sup>31</sup>.

### **ICP-MS profiles**

Chromatograms obtained with ICP-MS detection are shown for S, P, Cu, Zn, Mn, Fe and Se in Figures 2 and 3. These chromatograms show clearly that each element has its own species pattern of various level of complexity.

Retention times, estimated apparent molecular masses of eluted species and element quantities corresponding to individual peaks are summarised in Table 4.

Since quantitative S and P determination by ICP-MS is not feasible because  $^{31}\text{P}$  (monoisotopic) and  $^{32}\text{S}$  (95% abundance) are strongly interfered by  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NOH}^+$  and  $\text{COH}^+$ , we have only attempted to perform qualitative experiments to ascertain whether or not these analytes are present. Although these polyatomic interferences affect the background of all chromatograms, the analytical peaks of the chromatograms clearly indicate the presence of both P and S.

Sulphur detection is an indicator of the whole protein (sulphur containing aminoacids) content. The sulphur elution curve (Fig. 2) resembled the UV280 chromatogram to a large extent for retention times lower than 10 min. In fact, S coeluted with the first four high UV signals.

Sulphur appeared (Table 4) mainly distributed in high-medium molecular weight species (>300-45 kDa) (64% of the recovered S), while the remaining proteins were detected in the low molecular weight region (5 and 2 kDa). ICP-MS signals of sulphur obtained in this experiment also shows that the distribution of S among the five peaks varied considerably. Peak 1 and 4 accounted for 7% of the recovered S, whereas peaks 2, 3 and 5 accounted for 28-29% each one, respectively.

The pattern obtained for phosphorus (Fig. 2) turned out to be quite different. Phosphorous elution profile shows a dominant phosphorus peak in the low-molecular mass region at the elution time of 9.9 min preceded by a very small peak at the elution time of 6 min. This first signal accounts for more than 99% of total P. The estimated molecular mass of the major phosphorus species is approximately 5.5 kDa, whereas those of the minor phosphorus species are >300 kDa.

Data in Table 4 and Fig. 2 indicate that main species of copper and zinc were detected in the high-medium molecular mass region. About 89% of total Cu and 98% of total Zn are distributed between high and medium molecular weight proteins eluted from 6 min to 8 min with molecular weights ranging from 45 kDa up to >300 kDa. The prevailing species in this fraction (67% of total Cu and Zn, respectively) corresponds to proteins with a molecular weight of about 45 kDa.

About 11% of Cu and 2% of Zn was bound to low molecular weight proteins with the maximum peaks, corresponding to molecular weights of about 5, 2 and 1 kDa (10 to 11.5 min elution time).

Mn elution profiles of control liver cytosol (Table 4 and Fig. 2) shows that it appears both associated to high molecular weight proteins from >300 to 116 kDa (44% of total Mn), along with low molecular weight species (<1kDa) in a very broad zone (56% of total Mn).

The Fe elution profile (Table 4 and Fig. 2) clearly shows that it is mainly eluted in the region of high and medium molecular weight proteins. It shows the presence of two major peaks corresponded to high molecular mass region (>300 kDa; 60% of total Fe) and medium molecular mass region (45 kDa; 39% of total Fe).

Selenium (Table 4 and Fig. 3) is spread among several binding fractions, from high to low molecular weights (>300- 2 kDa).

According to the elution time of the calibrating proteins, the separated species correspond to compounds with the following molecular weights: 190 kDa, 45 kDa, 17 kDa, 3.8 kDa and 2.3 kDa. However, about 77% of total Se is eluted in 10 min. Therefore, Se appears mainly associated to high and medium molecular weight proteins.

The main forms of selenium are either selenomethionine unspecifically incorporated into proteins, or specific selenoproteins containing selenocysteine. The chromatographic profiles for selenium as protein-bound selenomethionine would be expected to mainly follow the total protein concentration, i.e. total methionine concentration. Peaks 1, 2 and 4 in liver cytosol were related to major UV peaks (Fig. 3). However, for several other high-molecular weight UV peaks there was very low selenium content, which suggests that only a low fraction of the soluble selenium in this liver extract was protein-bound selenomethionine.

Se peaks 3 and 5 coincided with very low UV absorbance indicating that most of it constituted specific selenoproteins.

#### **d) Mercury-selenium-trace elements interaction**

##### ***Mercury***

In order to evaluate mercury distribution and accumulation, total mercury content in the liver of the chickens fed Hg(II) and MeHg supplementation was determined (Table 5). Total mercury concentration varied between 22 and 304  $\mu\text{g kg}^{-1}$  depending on the Hg species exposure, being one order of magnitude lower when feed was enriched with inorganic mercury than when it was enriched with MeHg. This data is in good agreement with those previously reported where liver was found to be one of the most sensitive tissues to MeHg poisoning.

Furthermore, the extraction efficiency of mercury using Tris-HCl buffer was very high for inorganic mercury (90%), whereas MeHg was nearly equally distributed between the

cytosolic fraction (57%) and the pellet. Therefore, Hg(II) and MeHg had a different distribution on a subcellular level.

Long-term Se supplementation did not change the subcellular distribution of inorganic mercury, but it did modify the subcellular MeHg distribution. Concurrent administration of MeHg and sodium selenite caused a decrease in the percentage of Hg found in the cytosol (48%). Therefore, the mercury content increases in the pellet (nuclear/mitochondria fraction) when Se was supplemented as a result of a selenium-mercury interaction.

Similar results have been previously reported in rat and mice brains<sup>33-34</sup>, where the percentage of Hg in the nuclear fraction of neurones was increased, suggesting that the subcellular distribution of Hg in brain of MeHg exposed animals had been markedly influenced by Se treatment. In addition, the formation of stable and non-diffusible Hg-Se complexes of Hg and Se in liver has been previously suggested<sup>35</sup>.

Mercury in liver of the chickens fed Hg(II) was spread among several binding fractions (Fig. 4). Mercury appeared mainly associated to high and medium molecular weight proteins from >300 to 45 kDa (80% of total Hg), along with low molecular weight species (<10 kDa). The mercury chromatogram resembled the UV280 and S chromatogram to a relatively large extent, suggesting that Hg attaches to thiol-groups and binds to proteins.

Tissue accumulation of mercury is, according to several previous reports, due to mercury binding to -SH, carboxylic, and amino groups<sup>36-37</sup>. Both inorganic Hg and MeHg have been found to exhibit a high affinity for SH groups<sup>38-39</sup>, favouring the synthesis of metalloproteids forming less or more stable mercury compounds with proteins<sup>38-39</sup>. Thus, mercury is invariably found in cells and tissues attached to thiol-containing molecules such as protein or small molecular weight with thiols such as cysteine and glutathione. It is believed that the formation of mercury thiol bonds underlies both the toxicity and mobility of mercury in the body<sup>39</sup>.

Figure 4 shows how the intensity of <sup>202</sup>Hg signal varied considerably among the different treatments, however the speciation patterns obtained were quite similar for Hg(II) and MeHg treatments. Hg elution profiles of all mentioned samples showed a dominant Hg peak in the medium-molecular-mass region (45 kDa, accounting approximately 50% of the recovered Hg).

Hg distribution in inorganic Hg treatment was not affected by Se addition, however a noticeably lower signal was observed. This can be explained by findings of a previous work, where a drastic reduction on total Hg content in liver (78%) was observed after Hg(II)-sodium selenite co-administration<sup>40</sup>.

On the other hand, Se supplementation in MeHg treatment caused important changes in the Hg distribution pattern. Se supplementation favoured the formation of new low molecular weight species ( $\approx$ 1 kDa) and a small peak shift towards higher molecular weight. Therefore, the distribution of Hg among the 5 peaks varied considerably.

This effect was only observed when MeHg and Se(IV) were co-administered, indicating that a mercury-selenium interaction occurred in this organ as previously mentioned above.

### **Selenium**

To study the differences in Se distribution and accumulation, total Se content in the liver of the control chicken and chickens fed Hg(II) and MeHg supplementation was evaluated (Table 5).

As it can be seen, the presence of Hg did not cause a relevant effect on natural occurring levels of Se bioaccumulation, as well as on the extraction efficiency. Efficiencies around 30% were obtained for all the samples.

Se distribution patterns for the following treatments were recorded (Fig 5): Hg(II), Hg(II)+Se(IV), MeHg, MeHg+Se(IV) and some important differences were found between treatments.

The distribution of selenium among the peaks slightly varied when Hg(II) or Hg(II)+Se(IV) were added to the feed. However, we can observe that MeHg and MeHg + Se(IV) supplementation extensively modified the selenium chromatogram of the control liver (Fig. 3)

Presence of MeHg favoured the formation of high molecular weight selenium species. In addition, when Se was added to the MeHg treatment not only high molecular weight selenium species formation was favoured, but a new peak (accounting for almost 30% of selenium recovered) appeared at retention time of 10.9 min ( $\approx$  2kDa).

Cikrt and Becko suggested that Se affects the binding of Hg to proteins<sup>41</sup>; it has also been reported to direct the binding of Hg from LMW to HMW<sup>42</sup>.

Previous studies have shown the formation of high molecular weight complexes (containing Hg and Se) after 24h of Hg and Se coadministration<sup>35, 43</sup>.

The Se distribution changes observed when MeHg and Se were added to the feed was similar to the one found for MeHg, since the formation of high and low molecular weight species was observed, which corroborates the mercury-selenium interaction in the liver at subcellular level suggested previously.

Thus, this study provides new information about the distribution of Hg and Se in chicken liver after different treatments, emphasizing the relationship between mercury and selenium. But further studies are needed for additional identification of the different mercury and seleno compounds in the peaks using complementary techniques such as ESI-MS/MS in order to understand their metabolism.

## **Zinc**

Since the status of micro-nutritional elements and its species after Hg exposure is not well documented, the investigation on the differences of essential elements distribution after Hg exposition has been carried out.

The concentration and distribution patterns of trace elements were found to be stable when Hg(II) and Hg(II)+Se were added to the feed in comparison with the control group. Therefore, our data in this research indicated that there was no obvious adverse impact of Hg(II) on the concentration of trace elements in the liver, as well as in the species distribution.

On the other hand, a notorious effect on Zn distribution pattern was observed in MeHg exposed animals.

Fig. 6 depicts the SEC elution profiles of Zn obtained for the different treatments. As shown in this figure, the MeHg or MeHg+Se exposition alters the binding of the essential element Zn, diverting the binding of Zn from medium-molecular weight to high-molecular weight species. Zn associated to high-molecular weight species varies from 36% (control liver) to 48% (MeHg) and 56% (MeHg+Se) of the recovered Zn.

At this MeHg exposure concentration, mercury redistributes Zn in different molecular weight species. In fact, a peak of 100 kDa molecular weight disappeared and a new peak at 80kDa can be observed in the chromatograms.

Interaction of Zn with Cd has been previously reported<sup>44</sup>. Ferrarello et al. observed a change in the Zn distribution pattern when Cd and Se were co-administered to mussels. However, interactions of Hg with essential metals like Zn, Cu or Fe are not well documented. Flora et al.<sup>42</sup> suggested that Zn could play a significant role in detoxification mechanisms for Hg, but further studies targeted on Hg, Se and Zn are proposed in order to clarify their interaction.

## **CONCLUSIONS**

This paper provides information about the concentration of several trace element species in chicken liver and its molecular weight distribution. Total element concentration and distribution varied depending on the element according to its essentiality and biological functions, having each element its own distribution between the cytosolic fraction and the pellet, as well as its own species pattern.

The most important metal-binding biocompartment was found to be in the high and medium molecular weight pool, with a strong signal containing S, Cu, Zn, Fe, Se and Hg, suggesting the presence of proteins with various metals associated to its structure.

Long-term Hg or Hg+Se did not affect the multielemental concentration or distribution, whereas MeHg or MeHg+Se treatment did modify mercury, selenium and zinc distribution patterns.

MeHg and Hg presented different subcellular distribution, but quite similar pattern; however when Se was added to the MeHg treatment a change in the subcellular distribution and distribution pattern was observed. Se was also modified when MeHg or MeHg+Se was added to the diet. Thus, the MeHg+Se supplementation favours the formation of high and low molecular weight selenium and mercury-containing proteins, while high molecular weight Zn containing proteins are preferentially formed. These results support a significant interaction between Hg, Se and Zn when MeHg and Se are co-administered.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the CICYT project BQU2002-01348. One of the authors (A. Cabañero) wishes to thank the Complutense University for support through a predoctoral fellowship.

## REFERENCES

1. S. Río-Segade, C. Bendicho, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **14**, 263-268.
2. S. G. Patching and P. H. E. Gardiner, *J. Trace Elem Med. Biol.*, 1999, **13**, 193-197.
3. J. Parizek and I. Ostadalova, *Experientia*, 1967, **23**, 142-143.
4. M. A. A Cuvin-Aralar and R. W. Furness, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1991, **21**, 348-364.
5. S. Potter and G. Matrone, *J. Nutr.*, 1974, **104**, 638-647.
6. J. C. Hansen, P. Kristensen and S. N. Al-Masri, *Nord. Vet-Med.*, 1981, **33**, 57-64.
7. C. Watanabe, *Tohoku J. Exp. Med.*, 2002, **196**, 71-77.
8. V. Nishwitz, B. Michalke and A. Kettrup, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 444-451.
9. W. Feng, M. Wang, B. Li, J. Liu, A. Chai, J. Zhao, and G. Deng, *Toxicol. Lett.*, 1994, **152**, 223-234.
10. A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón and M. L. Fernández Sánchez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 236-247.
11. R. H. Holm, P. Kennepohl and E. I. Solomon, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2239-2314.
12. A. C. Rosensweig, *Chem. Biol.*, 2002, **9**, 673-677.
13. S. J. Lippard, J. M. Berg, in *Principles of Bioinorganic Chemistry*, eds, University Science Books, Mill Valley, California, 1994.
14. F. W. Outten, C. E. Outten and T. V. O'Halloran in *Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance*, eds, G. Storz, R. Hengge-Aronis, Bacterial Stress Response, ASM Press, Washington DC, 2000, p 145-157.
15. L. S. Busenlehner, M. A. Pennella and D. P. Giedroc, *Microbiol. Rev.*, 2003, **27**, 131-143.
16. J. Kuchar and R. P. Hausinger, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 509-525.
17. M. Wind and W. D. Lehmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 20-25.
18. R. Koplík, M. Borková, O. Mestek, J. Komínková and M. Suchánek, *J. Chromatogr., B*, 2002, **775**, 179-187.
19. N. Jakubowski, R. Lobinski and L. Moens, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1-4,
20. C. Daun, T. Lundh, G. Önning, B. Åkesson, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 129-134.
21. J. Wnag, D. Dreessen, D. R. Wiederin, R. S. Houk, *Anal. Biochem.*, 2001, **288**, 89-96
22. G. Önning and I. A. Bergdahl, *Analyst*, 1999, **124**, 1435-1438.
23. H. Goenaga Infante, K. V. Campenhout, D. Schaumlöffel, R. Blust and F. C. Adams, *Analyst*, 2003, **128**, 651-657.
24. B. Michalke, P. Schramel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 121-138.



25. R. R. de la Flor St.Remy, M. L. Fernández Sánchez, J. B. López Sastre and A. Sanz-Medel. *J.Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1104-1110.
26. J. Szpunar, P. Pellerin, A. Makarow, T. Doco, P. Williams, B. Medina and R. Lobinski, *J.Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 749-754.
27. S. Mounicou, J. Meija and J. Caruso, *Analyst*, 2004, **129**, 116-123.
28. V. Vacchina, D. Polec and J. Szpunar, *J.Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1557-1566.
29. O. Mestek, J. Komínková, R. Koplík, M. Borková and M. Suchánek, *Talanta*, 2002, **57**, 1133-1142.
30. B. A. Lesniewska, J. Messerschmidt, N. Jakubowski and A. Hulanicki, *Sci. Total Environ.*, 2004, **322**, 95-108.
31. K. Ødegård and W. Lund, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, **12**, 403-408.
32. A. Richarz, C. Wolf and P. Brätter, *Analyst*, 2003, **128**, 640-645.
33. B. Møller-Madsen and G. Dansher, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991, **108**, 457-473.
34. A. Wicklund Glynn and Y. Lind, *Pharmacol. Toxicol.*, 1995, **77**, 41-47.
35. N. Imura and A. Naganuma in *Possible mechanism of detoxifying effect of selenium on the toxicity of mercury compounds: Advances in Mercury Toxicology*, eds. T. Zuxuki et al. Plenum Press, New York, 1991, p. 275-288.
36. F. Iverson, R. H Downie, G. L. Trenholm and C. Paul, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1974, **27**, 60-69.
37. G. L Diamond and R. K Zalups, *Toxicol. Pathol.*, 1998, **26**, 1, 92-103.
38. W. L. A. Hughes, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1956-7, **65**, 454-459.
39. T. W. Clarkson, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1997, **34**(3), 369-403.
40. A. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, in press.
41. M. Cikrt and V. Bencko, *Toxicol. Lett.*, 1989, **48**, 159-164.
42. G. J. S. Flora, R. Mathur, N. Sandhu and K. K. Dua, *Indian J. Pharmacol.*, 1994, **26**, 209-212.
43. A. Naganuma and N. Imva, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1981, **15**, 449-452.
44. C. N. Ferrarrello, M. Fernández de la Campa, J. F. Carrasco and A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2002, **57**, 439-449.

**Table 1.** Experimental set-up

<b>Treatment</b>	<b>no. of pens</b>	<b>Total no. of chickens</b>
<b>Basal diet</b>		
<b>Control</b>	1	8
<b>Basal diet + Hg(II) [0.2 mg kg<sup>-1</sup> in feed]</b>		
<b>Control</b>	2	16
<b>+ Selenium (0.2 mg kg<sup>-1</sup> in feed)</b>	2	16
<b>Basal diet + MeHg [0.2 mg kg<sup>-1</sup> in feed]</b>		
<b>Control</b>	2	16
<b>+ Selenium (0.2 mg kg<sup>-1</sup> in feed)</b>	2	16
<b>Total</b>	9	72

**Table 2.** Operating conditions for element determination by ICP-MS and SEC-ICP-MS

<b>ICP-MS Operating Conditions</b>	
Forward Power	1300 W
Plasma gas (Ar)	15 l min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas (Ar)	1.26 l min <sup>-1</sup>
Nebuliser gas (Ar)	1.11 l min <sup>-1</sup>
Spray chamber	Double pass (Scott type)
Nebuliser	Babington
Skimmer cone	Nickel, 0.4 mm orifice
Sampling cone	Nickel, 1.0 mm orifice
Acquisition mode	TRA
Points per peak	3
Integration time	0.7 s
Isotopes monitored	<sup>31</sup> P, <sup>34</sup> S, <sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>78</sup> Se, <sup>82</sup> Se, <sup>111</sup> Cd, <sup>200</sup> Hg, <sup>201</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg
<b>SEC</b>	
Analytical column	Biosep-SEC-2000
Mobile phase	25 mM Tris-HCl buffer- 50 mM KCl (pH=6.8)
Injection volume	200 µl
Flow rate	1.0 ml min <sup>-1</sup>

**Table 3.** Total metal contents in the fresh liver from control group and the percentage amount of these contents in a buffered extract (25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7.5).

Element	Total content in liver ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Extraction efficiency (%)	Reference material (certified value)	Reference material <sup>c</sup> (experimental value)
Cr	$2.69 \pm 0.09$	$33 \pm 1$	$0.80 \pm 0.08$	$0.9 \pm 0.1$
Co	$0.041 \pm 0.001$	$67 \pm 3$	$0.35^b$	$0.34 \pm 0.01$
Cu	$3.70 \pm 0.06$	$53 \pm 1$	$9.60 \pm 0.16$	$9.2 \pm 0.7$
Zn	$14.9 \pm 0.6$	$69 \pm 3$	$76 \pm 2$	$72 \pm 5$
As	$0.112 \pm 0.004$	$70 \pm 4$	$5.9 \pm 0.2$	$5.7 \pm 0.2$
Se	$0.45 \pm 0.08$	$32 \pm 2$	$7.37 \pm 0.91$	$7.45 \pm 0.78$
Cd	$0.019 \pm 0.001$	$55 \pm 4$	$0.34 \pm 0.02$	$0.37 \pm 0.04$
Fe	$114.9 \pm 5.1$	$57 \pm 2$	--	--
Mn	$1.12 \pm 0.03$	$51 \pm 3$	$7.3 \pm 0.2$	$7.4 \pm 0.5$
Hg	nd	nd	$2.84 \pm 0.09$	$2.85 \pm 0.16$

<sup>a</sup> Results expressed as mean value  $\pm$  SD for 4 determinations

<sup>b</sup> Recommended value

<sup>c</sup> Reference material: CRM 278R

**Table 4.** Element distribution by molecular weight of associated molecules in aqueous extracts of chicken liver

Element	Retention time <i>t<sub>r</sub></i> (min)	Molecular weight MW	Peak area (%) <sup>a</sup>
<b>S</b>	6.03	>300	7
	6.85	170	29
	8.00	50	29
	9.84	5.7	7
	10.73	2.2	28
<b>P</b>	5.99	>300	1
	9.32	5.5	<b>99</b>
<b>Cu</b>	5.92	>300	4
	7.06	135	18
	8.09	45	<b>67</b>
	10.14	4.7	8
	10.81	2.2	}
	11.54	1.1	
<b>Zn</b>	5.99	>300	7
	6.74	205	13
	7.35	100	11
	8.05	46	<b>67</b>
	10.08	4.7	}
	10.79	2.2	
	11.52	1.1	
<b>Se</b>	Broad zone	>300	}
	7.01	190	
	8.04	45	20
	8.97	17	30
	10.31	3.8	8
	10.79	2.3	13
<b>Mn</b>	6.44	>300	7
	7.23	116	37
	14.64	0.03 <sup>b</sup>	<b>56</b>
<b>Fe</b>	5.99	>300	<b>60</b>
	8.05	47	39
	9.9	6	1

<sup>a</sup> Percentage of total amount of the element present in injected volume of liver extract. (Element peak area) /  $\Sigma$ element peak areas)

<sup>b</sup> Estimation is out of optimum fractionation range of the column (1-300 kDa) given by the producer.

**Table 5.** Total mercury and selenium concentrations in fresh chicken livers after Hg(II) and MeHg supplementation.

	TREATMENT		
	Basal diet	Basal diet + Hg(II) (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)	Basal diet + MeHg (0.2 mg kg <sup>-1</sup> in feed)
<b>Total Hg</b> (µg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	nd	22 ± 4	304 ± 36
<b>Total Se</b> (µg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	450 ± 83	385 ± 69	465 ± 118

<sup>a</sup> Results of six independent chickens for each group. Three replicates for each measurement (mean value ± SD)

## FIGURES CAPTION

Fig 1. SEC-UV chromatogram of chicken liver. The black line shows the UV absorbance (280 nm) and the dotted line the UV absorbance (250 nm).

Fig 2. Chromatograms obtained by SEC(300-1 kDa)-ICP-MS for chicken liver extract.

Fig 3. Chromatograms obtained by SEC-ICP-MS: Selenium distribution profile.

Fig 4. Mercury distribution profile after: Hg(II); Hg(II)+Se(IV); MeHg; MeHg+ Se(IV) treatment.

Fig 5. Selenium distribution profile after: (A) Hg(II); (B) Hg(II)+Se(IV); (C) MeHg; (D) MeHg+ Se(IV) treatment.

Fig 6. Zinc distribution profile after: (A) control; (B) Hg(II); (C) Hg(II)+Se(IV); (D) MeHg; (E) MeHg+ Se(IV) treatment.

Figure 1.

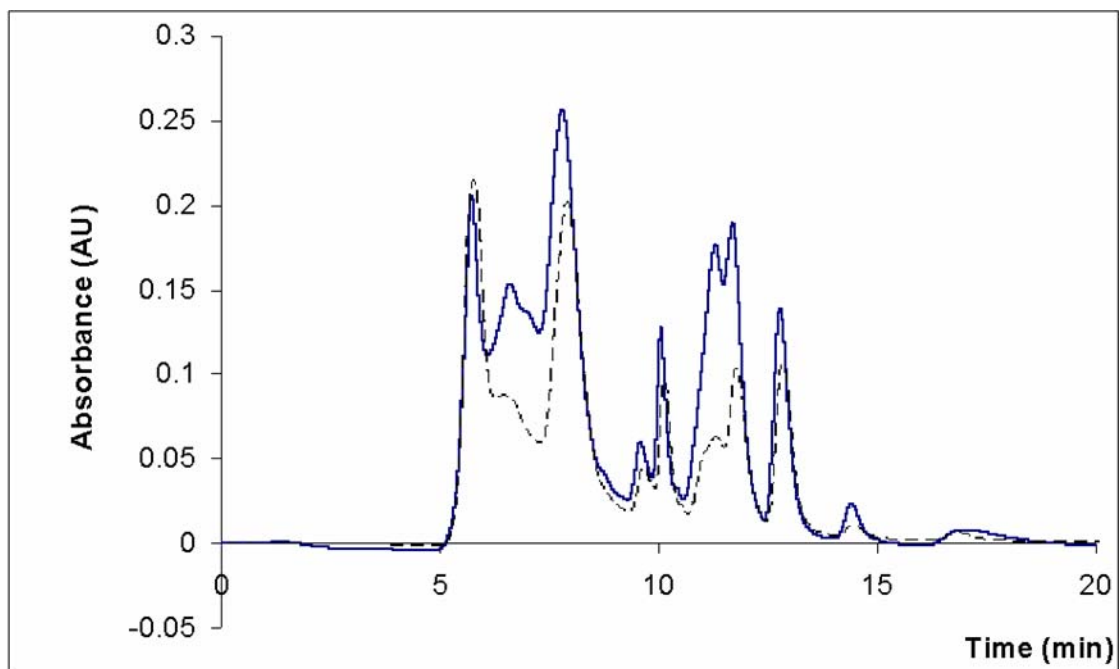




Figure 2

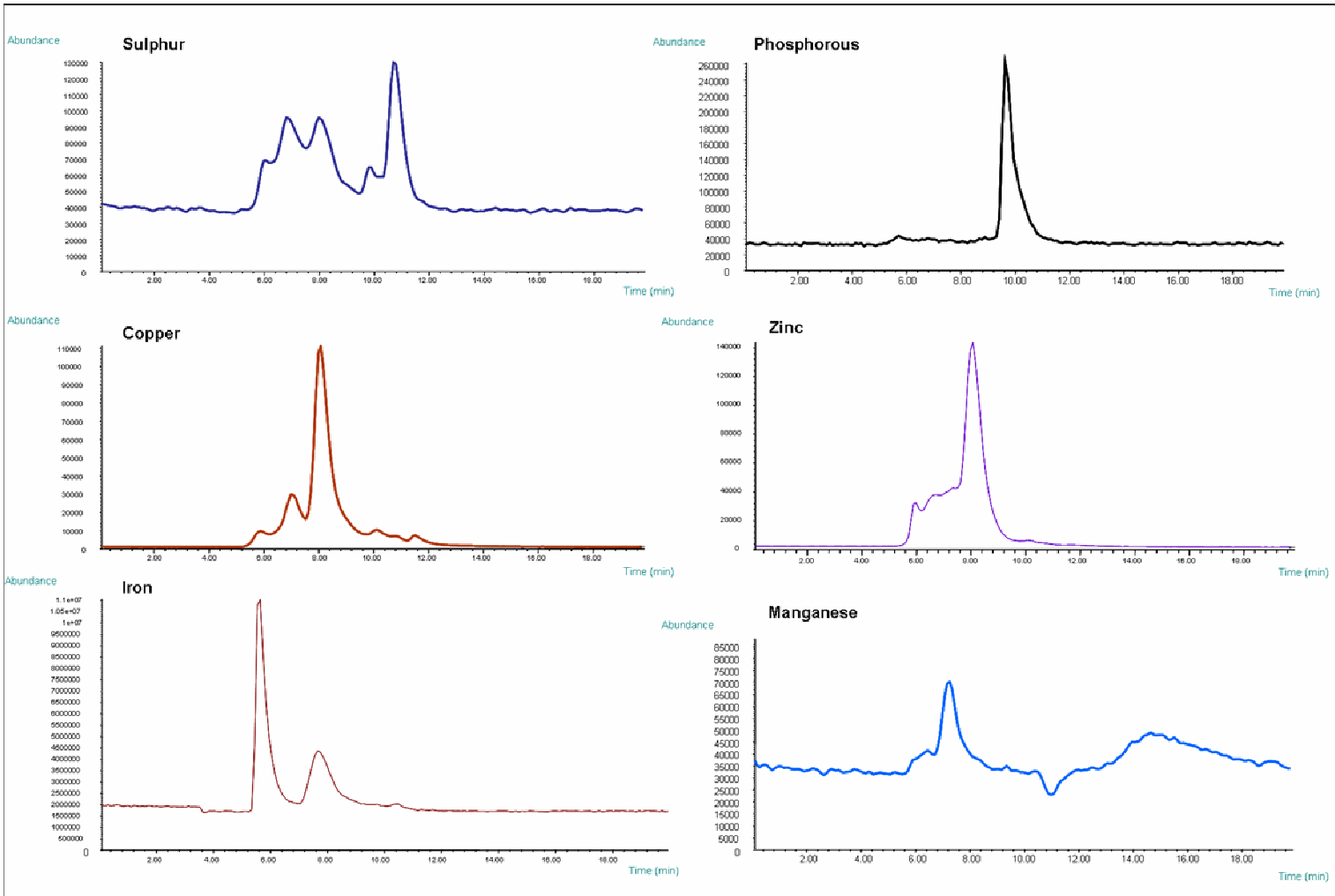


Figure 3

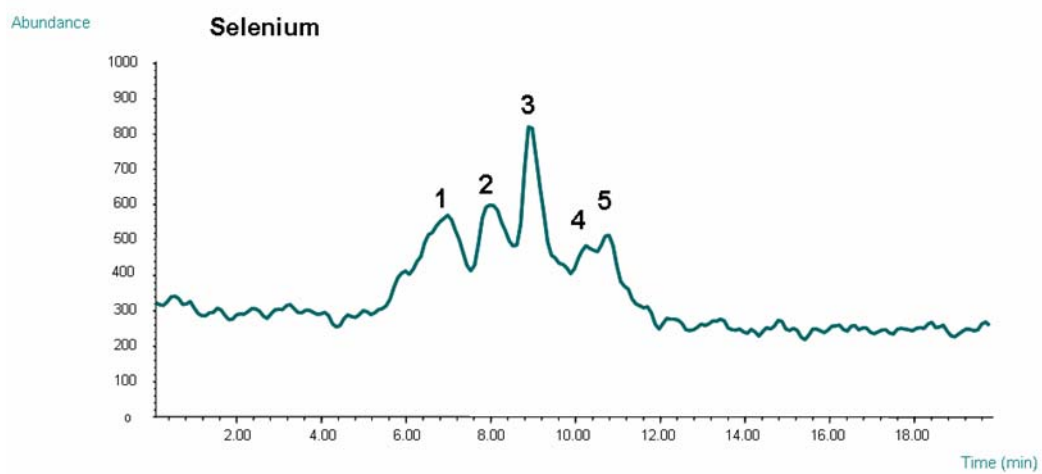


Figure 4

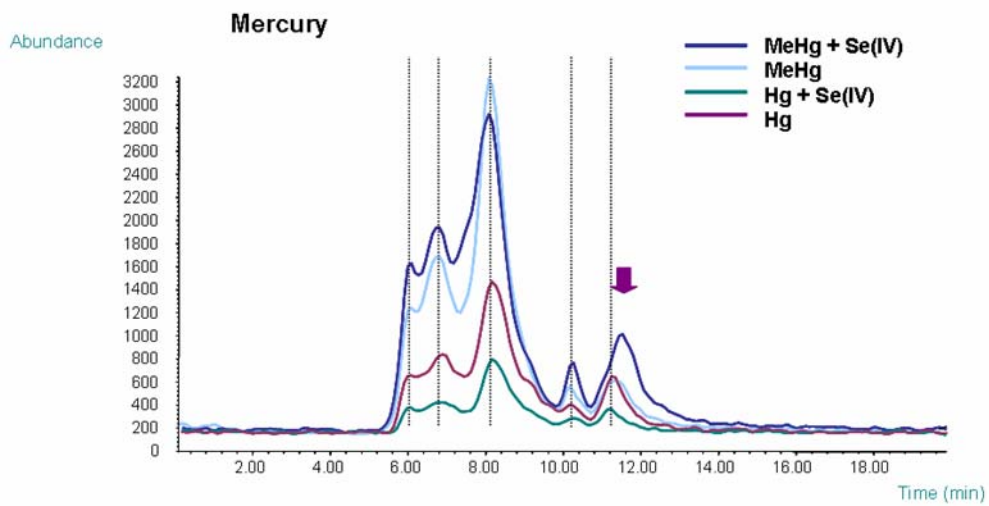


Figure 5

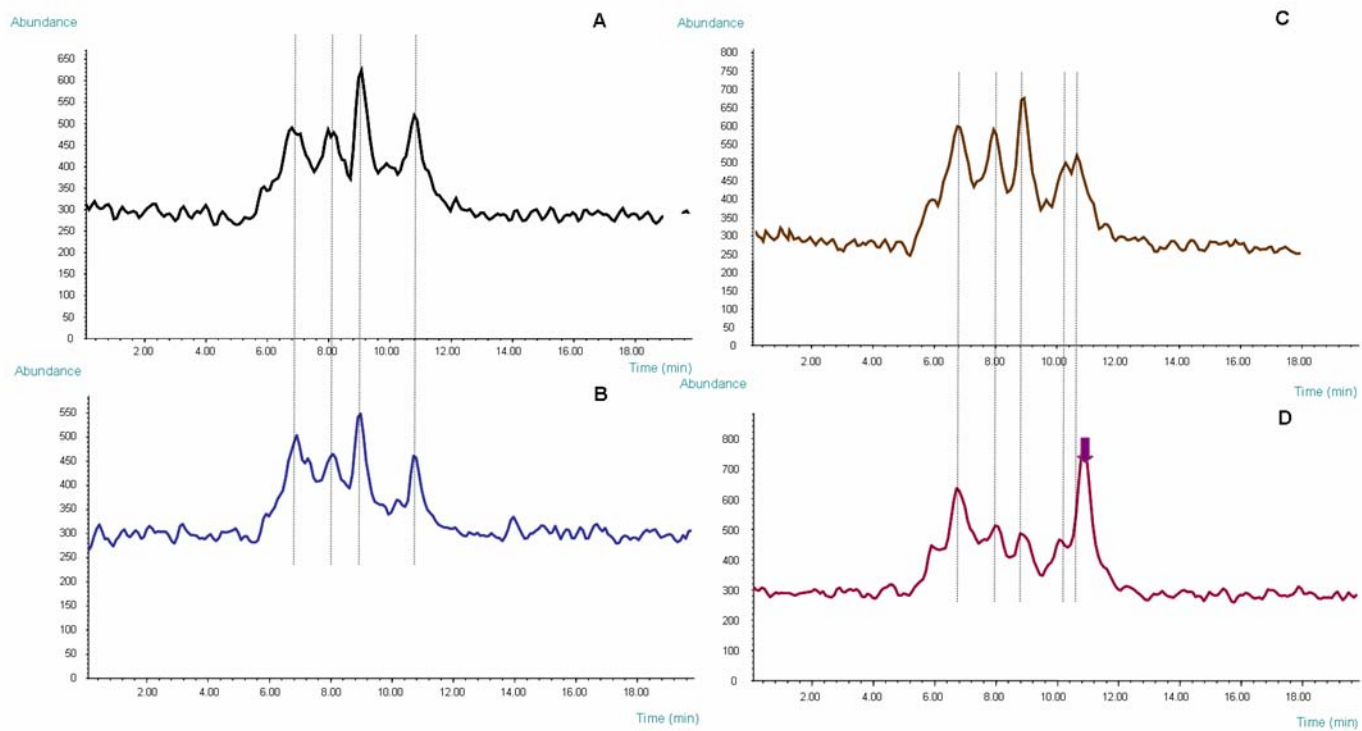
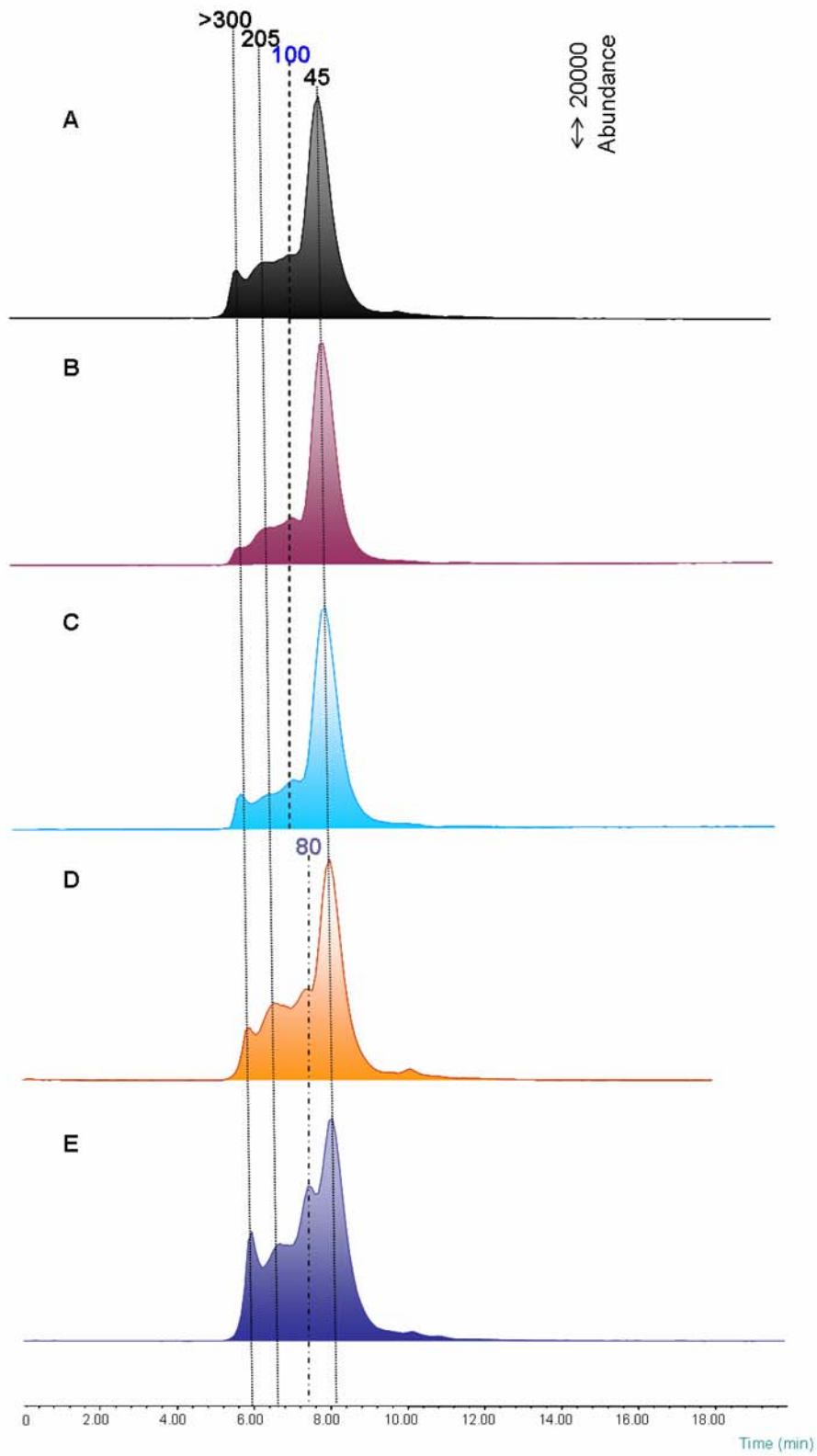


Figure 6



*D*

# Discusión Integradora

## **DISCUSIÓN INTEGRADORA**

El trabajo de investigación desarrollado en esta memoria presenta una doble finalidad. Por un lado se ha abordado de forma global la resolución de los problemas analíticos que se presentan en la determinación del contenido total de mercurio y selenio y sus especies en muestras de interés biológico y nutricional. Para ello fue imprescindible desarrollar nuevos métodos de tratamiento de muestra que mejorasen las prestaciones de los ya existentes, en cuanto a reducción del tiempo empleado, simplicidad en el procedimiento y aumento de las recuperaciones; preservando en todo momento las especies originalmente presentes en la muestra.

Por otra parte, una vez desarrollada y validada la nueva metodología analítica, se aplicó a la determinación del contenido total de mercurio y selenio y sus especies e interacción con proteínas en alimentos de elevado consumo (principal vía de entrada de mercurio y selenio en el organismo). Paralelamente los resultados obtenidos se han utilizado como herramienta para conocer los mecanismos de acumulación, distribución, transformación e interacción del mercurio y selenio en animales.

### **Desarrollo del trabajo realizado de forma globalizada**

El trabajo desarrollado a lo largo de la presente memoria queda resumido en los siguientes puntos.

#### ***Extracción de mercurio y sus especies***

Desde que el inicio de la era industrial supusiera un aumento considerable en los niveles de mercurio en el medioambiente se han realizado numerosos esfuerzos para el desarrollo de una metodología analítica fiable con el fin de llevar a cabo la elucidación de las especies de mercurio presentes en los distintos compartimentos medioambientales. De hecho, la validación de los métodos analíticos de especiación de mercurio en alimentos y materiales biológicos constituye todavía un reto analítico debido a los riesgos asociados al proceso: pre-tratamiento de la muestra, volatilización, contaminación, transformación de especies durante el proceso de extracción, derivatización, etc.

En nuestro caso, en primer lugar se abordó el desarrollo de procedimientos de pre-tratamiento de muestra reproducibles y eficaces que asegurasen tanto la integridad de las distintas formas químicas presentes como la de sus concentraciones.

Puesto que las muestras no siempre pueden ser analizadas inmediatamente después de la toma de muestra, y teniendo en cuenta que la homogeneización así como la

extracción de los analitos y su conservación se ve favorecida en muestras desecadas, es importante evaluar los posibles riesgos asociados a la etapa de secado. Por tanto, con fines analíticos habrá que seleccionar las mejores condiciones de pre-tratamiento para llevar a cabo el análisis del mercurio sin que se altere su concentración original. En este sentido se evaluaron los riesgos asociados de pérdida de mercurio en tres procedimientos de secado: secado en estufa, microondas y liofilización. Los tratamientos se aplicaron principalmente a muestras de atún y pez espada por tener un contenido en mercurio medio y alto. El empleo de una estufa convencional durante 48 h a una temperatura de 40°C permitió el secado de las muestras sin que se detectasen pérdidas debidas a la posible volatilización del mercurio. Sin embargo, el empleo del horno microondas y el proceso de liofilización condujeron a pérdidas del 13% y 65%, respectivamente. Estos resultados experimentales ponen de manifiesto el hecho de que ambos procesos pueden constituir una fuente de error en la determinación del mercurio total y sus especies en muestras de tejidos animales. Además, el proceso de liofilización no sólo puede provocar pérdidas de especies volátiles, sino que algunas especies de interés pueden verse modificadas debido a la degradación del enlace metal-proteína que algunas muestras pueden experimentar. El hecho de que la bibliografía en este sentido no sea concordante puede deberse a la naturaleza de las especies presentes en la muestra. Por lo tanto, estos resultados se deberán tener en cuenta para prevenir la pérdida de analitos de interés, y consecuentemente, los errores que se pueden derivar, y deberán ser considerados muy especialmente cuando se aborde la preparación de materiales de referencia, puesto que la mayoría emplean la liofilización en su preparación.

A continuación se evaluó la extracción del mercurio en medio ácido (HCl), básico fuerte (KOH/MeOH) y débil (TMAH/MeOH) y con el tensoactivo dodecilsulfato sódico (SDS).

La extracción ácida es la opción más utilizada para extraer mercurio, aunque la capacidad de la extracción alcalina de romper enlaces proteína-Hg o lípido-Hg no debe olvidarse cuando se analizan especies de mercurio en tejidos biológicos.

Debido a la afinidad del mercurio con el azufre, y el hecho de que el SDS se haya empleado en la extracción de otros metales, nos hizo pensar en un primer momento en su posible capacidad extractante.

Para minimizar las desventajas de los procedimientos de extracción convencionales en términos de tiempo, eficiencia y consumo de reactivos, estos se llevaron a cabo en un baño de ultrasonidos, acelerándose de esta forma el proceso de extracción.

Las variables optimizadas fueron: la concentración, el volumen de extracción de los reactivos, y el tiempo de sonicación. Los resultados obtenidos mostraron que el único



procedimiento que permitía la extracción cuantitativa de mercurio fue la extracción ácida, empleando 5 ml de HCl 5 M durante cinco minutos.

La determinación del contenido total de mercurio y sus especies en muestras sólidas requiere de la obtención de extractos líquidos en los que las especies de interés sean estables. Sin embargo, en muchas ocasiones la estabilidad de las especies varía en función del procedimiento de extracción llevado a cabo y el tipo de muestra. El conocimiento de este dato en muestras reales, es de gran importancia, ya que permite su almacenamiento sin pérdidas del analito de interés, evitándose el análisis inmediato.

La evaluación de la estabilidad del mercurio en los extractos ácidos demostró que estos eran estables a temperatura ambiente por lo menos durante una semana. Asimismo se estudió la recuperación, mediante el empleo de disoluciones patrón de las especies sometidas a un tratamiento equivalente a la muestra, observándose su estabilidad durante todo el proceso.

La extracción de las especies de mercurio en muestras complejas constituye una etapa crucial ya que las especies deben extraerse cuantitativamente, preservando en todo momento su forma química.

Para poder evaluar la integridad de las especies extraídas, los extractos procedentes de las extracciones alcalina y ácida fueron sometidos a un análisis selectivo (reducción con cloruro de estaño y detección con CV-AFS) y a un análisis de especiación mediante el acoplamiento GC-pyro-AFS después de la extracción directa en un disolvente orgánico (diclorometano) y una etapa de limpieza.

El empleo del análisis selectivo permite la determinación del mercurio inorgánico de forma directa y del mercurio total mediante el mismo procedimiento, pero con una etapa previa de digestión de los extractos con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno. El mercurio orgánico se calcula por diferencia de los valores obtenidos en estas dos etapas. En lo que respecta a GC-pyro-AFS, este acoplamiento permite la determinación individual de las especies en tiempo real.

En las muestras tratadas con ácido clorhídrico o con KOH/MeOH sólo se detectó una especie orgánica, el metilmercurio, sin embargo, cuando se empleó TMAH/MeOH se detectaron dos especies orgánicas de mercurio, metilmercurio y dimetilmercurio. Por lo tanto, el tratamiento en medio básico débil supone la formación artificial de la especie dimetilmercurio durante la extracción. Asimismo se evaluó la posible formación artificial de dimetilmercurio en disoluciones patrón de metilmercurio sometidas a las mismas condiciones que la muestra, obteniéndose el mismo resultado, lo que corroboraba el hecho de que el tratamiento de la muestra con TMAH puede ocasionar la metilación del metilmercurio en un 5%, constituyendo una fuente de error en la identificación y cuantificación de las especies de mercurio.

De los datos expuestos se puede concluir que el proceso de secado de las muestras de pescado en estufa (40°C) y la extracción con HCl de las especies de mercurio son dos tratamientos adecuados ya que se minimizan los riesgos de pérdidas en el proceso de pre-tratamiento, siendo su extracción cuantitativa y preservándose las especies.

Así pues, la metodología propuesta permite llevar a cabo la determinación de las especies de metilmercurio, dimetilmercurio y etilmercurio en muestras biológicas mediante el acoplamiento GC-pyro-AFS sin la necesidad de emplear procedimientos de derivatización por etilación. Por otra parte, la cuantificación del metilmercurio y mercurio inorgánico en el extracto ácido por ambos métodos (CV-AFS y GC-pyro-AFS) pusieron de relieve que el análisis selectivo permite discernir entre mercurio inorgánico y mercurio orgánico de forma rápida, y con posibilidad de limitar los posibles errores debido al bajo número de etapas implicadas en el proceso, la mínima preparación de la muestra y al corto período de análisis, si se compara con métodos cromatográficos.

### ***Extracción de selenio y sus especies***

El descubrimiento de nuevas especies de Se y el importante papel que juega este elemento en los procesos vitales, ha originado un gran interés en el desarrollo de metodologías analíticas fiables para la detección, elucidación y cuantificación de selenocompuestos en muestras de interés clínico y nutricional.

En la actualidad existen numerosos procedimientos de extracción del selenio total y sus especies en muestras biológicas. Dado que en los tejidos animales el selenio se encuentra mayoritariamente incorporado a las proteínas, formando parte de las selenoproteínas, la mayoría de estos procedimientos están basados en hidrólisis ácidas, básicas o enzimáticas.

Las hidrólisis ácidas y básicas provocan en algunos casos la degradación de especies de selenio. Sin embargo, la hidrólisis enzimática proporciona resultados más prometedores, aunque este tratamiento se caracteriza por los elevados tiempos de incubación requeridos. Por ello, se propuso realizar una hidrólisis enzimática empleando una enzima no específica (*Streptomyces Griseus*), que permitiera la extracción de las especies de selenio de forma reproducible. Con el fin de disminuir los tiempos de extracción, la hidrólisis se realizó con la ayuda de una sonda de ultrasonidos. La metodología se aplicó a muestras de músculo, riñón e hígado de pollo y muestras de pienso.

Con el fin de optimizar los parámetros involucrados en el proceso de hidrólisis se estudiaron las siguientes variables: tiempo de sonicación, naturaleza del extractante, temperatura, cantidad de enzima, amplitud del ultrasonidos y cantidad de muestra.

En primer lugar se evaluó el efecto del tiempo de sonicación (10s-5min) y del medio extractante (H<sub>2</sub>O y tampón Tris-HCl) sobre la eficiencia de extracción. Los resultados experimentales mostraron que la eficiencia de extracción aumenta conforme se aumenta el tiempo de sonicación alcanzándose la máxima recuperación a los dos minutos. Por otro lado, el empleo de la disolución reguladora Tris-HCl condujo a una recuperación superior si se compara con el medio acuoso, tal y como cabría de esperar, puesto que las enzimas requieren un control de pH, de otro modo, la actividad enzimática puede verse reducida o incluso inhibida.

Puesto que la temperatura es otro factor que ha de controlarse para asegurar la óptima actividad enzimática, y teniendo en cuenta que esta se incrementa como consecuencia de la cavitación acústica, se estudió la influencia de la temperatura externa del vial (0°-25°C) en la recuperación del selenio. El control de la temperatura no mejoró la eficiencia de extracción, por lo que se seleccionó la temperatura ambiente como temperatura de trabajo óptima.

Por otra parte, se evaluó el efecto de la cantidad de enzima sobre la eficiencia de extracción. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de selenio total extraída aumenta con la cantidad de enzima, obteniéndose recuperaciones cuantitativas con 20% (m/m) de enzima. La extracción de Se sólo fue cuantitativa cuando la energía de ultrasonidos se aplicó en presencia de la enzima, hecho que corroboró la suposición inicial de que una elevada fracción del selenio total en los tejidos del pollo se encuentra enlazado a proteínas.

El período de tiempo extremadamente corto necesario para extraer las especies (2 minutos con ultrasonidos frente a 48 horas en ausencia de ultrasonidos) sugirió que la sonda de ultrasonidos facilita la ruptura de la pared celular de los tejidos estudiados, lo que favorece el contacto entre la enzima y los componentes intracelulares, que normalmente no pueden entrar en contacto con la enzima, o sólo lo consiguen después de elevados tiempos de incubación.

Finalmente, se investigó el efecto que ejerce la cantidad de muestra y la amplitud del ultrasonido en la extracción del selenio. El aumento de la cantidad de muestra (25-200 mg) así como la variación de la amplitud del ultrasonidos en el intervalo estudiado (10-30%) no influyeron en la recuperación del Se.

El método de tratamiento de muestra desarrollado permite extraer cuantitativamente el selenio en muestras de origen animal y vegetal en un periodo de tiempo extremadamente corto, reduciendo así drásticamente el tiempo involucrado con el empleo de los métodos tradicionales.

Una vez desarrollada la metodología para la extracción de selenio total se abordó el mismo estudio pero para la extracción de especies. Las mejores recuperaciones se obtuvieron trabajando bajo las condiciones óptimas comentadas con anterioridad (20% enzima, tampón Tris-HCl, 2 min).

Tras la hidrólisis enzimática en Tris-HCl los compuestos de selenio extraídos se procesaron por ultrafiltración a través de filtros de corte molecular de 10 kDa. Los resultados obtenidos, tras medida por ICP-MS, mostraron que el 50, 62, 70 y 93% del selenio extraído en muestras de riñón, hígado, músculo y pienso, respectivamente, mostraba un peso molecular inferior a este tamaño, lo que implica que parte del selenio permanecía aún en forma peptídica. Este hecho se debe a que durante la hidrólisis enzimática de proteínas algunos de los enlaces peptídicos pueden permanecer inalterados, dependiendo de la especificidad de la enzima utilizada.

Con el fin de asegurar que los compuestos de tamaño molecular inferior a los 10 kDa no eran retenidos en los filtros, se determinó el contenido total en disoluciones patrón sometidas a las mismas condiciones experimentales de tratamiento de muestra, después de su filtración. El método propuesto supuso la recuperación cuantitativa del selenio, lo que implicaba la ausencia de errores ocasionados por pérdidas con este tratamiento de muestra.

Para determinar la naturaleza de las especies de selenio presentes se empleó el acoplamiento HPLC-ICP-MS, con cromatografía de intercambio iónico, debido a la naturaleza de las especies estudiadas (selenoaminoácidos,  $\text{TMSe}^+$  y especies inorgánicas). La separación de las especies tuvo lugar empleando una columna de intercambio catiónico (Hamilton PRP-X200) bajo dos condiciones cromatográficas diferentes (pH, 2.8 y 4.7), con el fin de una identificación inequívoca de las especies de selenio. La fase móvil seleccionada fue formiato de piridina 4mM. Se observó que el orden de elución estaba relacionado con el pH, siendo posible la identificación de estas especies en menos de 20 minutos.

Los resultados obtenidos muestran que los mecanismos de interacción no obedecen, únicamente, a interacciones de tipo iónico, dado que la especie  $\text{Se(VI)}$  es la especie más retenida a los dos pHs de trabajo. Como consecuencia, deben existir mecanismos secundarios de interacción, como son los de naturaleza hidrofóbica entre la muestra y las regiones no iónicas de la fase estacionaria polimérica.

El análisis cromatográfico de los extractos de los hidrolizados de las muestras mostró la presencia de dos picos. El primer pico corresponde a un compuesto de Se no identificado, y podría deberse a una especie aniónica de selenio que eluyese en el volumen muerto. Por el contrario, el segundo pico se identificó por comparación de los tiempos de retención y adición estándar, como selenometionina.

Por lo tanto, el método propuesto permitió la identificación de un selenoaminoácido y su cuantificación en las cuatro muestras analizadas. El porcentaje de SeMet con respecto al selenio total varía con el tipo de muestra. En el caso del pienso el 90% del selenio total se encontraba en forma de SeMet. Puesto que muchas plantas transforman predominantemente el selenio a SeMet, y teniendo en cuenta que los principales componentes del pienso son: maíz, trigo y soja, el valor encontrado es comparable con el que aparece en la bibliografía para este tipo de cereales.

Por el contrario, en los tejidos animales el porcentaje de SeMet encontrado fue inferior: 51, 13 y 8% del selenio total en el músculo, hígado y riñón de pollo, respectivamente. Los animales no son capaces de sintetizar SeMet, por lo que esta proviene de su dieta. Además, la SeMet se incorpora en las proteínas de tejidos en el lugar de la metionina, especialmente en los músculos esqueléticos y el hígado, lo que hace del músculo esquelético la mayor reserva de Se. Por ello, la concentración encontrada en el músculo es superior a la encontrada en los otros órganos.

Una vez realizada la detección y cuantificación de las especies, se evaluó la estabilidad de las mismas durante el proceso de tratamiento de muestra propuesto. Las condiciones de extracción deben ser cuidadosamente seleccionadas para conseguir la hidrólisis completa de las proteínas con una mínima destrucción de las especies de selenio. Además, no se debe olvidar la posibilidad de que el método empleado de extracción pueda suponer la transformación de las especies de selenio, y por lo tanto que su contenido en los extractos pueda cambiar con respecto a la muestra en estado sólido.

Con el fin de mejorar la eficiencia del proceso en términos de recuperación de especies, preservando la integridad de las mismas, se aumentó el tiempo de sonicación hasta 6 minutos. Los resultados mostraron que el hecho de incrementar esta variable no modificaba el rendimiento de la extracción ni los cromatogramas obtenidos, es decir, que no apareció ninguna especie adicional. Este hecho ratifica la ausencia de interconversión entre las especies de selenio presentes en las muestras.

Análogamente al estudio realizado para el mercurio, se evaluó la estabilidad de las especies de selenio en los extractos tras 48 h a temperatura ambiente. Se demostró que las especies permanecían estables y por lo tanto, nuestros resultados son comparables con los proporcionados por otros procesos enzimáticos que requieren períodos de incubación elevados (24-48h).

Finalmente, y debido a la ausencia de materiales de referencia (uno de los mayores limitaciones de la especiación), los resultados derivados de la especiación fueron comparados con los obtenidos por un método enzimático previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación. Se obtuvieron los mismos perfiles cromatográficos, y los mismos porcentajes de SeMet que los anteriormente comentados. Por lo tanto, el empleo de la hidrólisis enzimática asistida por sonda de ultrasonidos (EPS) proporciona resultados

comparables a los obtenidos por otros procesos enzimáticos que requieren un tratamiento de muestra mucho más largo.

De los datos expuestos se puede concluir que el método propuesto (hidrólisis enzimática + sonda de ultrasonidos) ofrece la posibilidad de extraer el selenio total de muestras biológicas en un tiempo muy inferior al requerido por otros procedimientos, además de tratarse de un método caracterizado por el bajo consumo de reactivos, la simplicidad y seguridad del procedimiento. Paralelamente, este método ha permitido disminuir drásticamente (tres órdenes de magnitud) el tiempo involucrado en la hidrólisis enzimática de las muestras, si se compara con los métodos establecidos hasta el momento, sin que se originen pérdidas ni transformaciones de las especies químicas estudiadas. Al mismo tiempo, la acción conjunta de la energía de ultrasonidos y la de la enzima permite la extracción cuantitativa del selenio en un solo paso y sin necesidad de controlar la temperatura, a diferencia de lo que ocurre en otros métodos. Consecuentemente, las expectativas y perspectivas de aplicación derivadas del empleo conjunto de enzimas y el ultrasonidos son bastante elevadas.

### ***Validación de la metodología***

El aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos implica el empleo de materiales de referencia certificados con los que contrastar los resultados obtenidos. Idealmente, el material de referencia seleccionado debe ser muy similar en matriz y composición a la muestra objeto de estudio.

Para establecer el rendimiento de la extracción de mercurio en las muestras de pescado, el procedimiento de hidrólisis ácida se aplicó sobre el BCR-463 (atún certificado en MeHg). Los valores obtenidos pusieron de manifiesto la no existencia de diferencias significativas (nivel de probabilidad 95%) entre los resultados y el valor certificado.

En el caso del procedimiento desarrollado para la extracción cuantitativa de selenio en muestras biológicas mediante la combinación de la sonda de ultrasonidos y la hidrólisis enzimáticas éste se validó empleando el CRM 278 (mejillón certificado en Se). En todos los casos las diferencias encontradas entre el valor certificado y el obtenido mediante el método no fueron significativas al nivel de probabilidad del 95%.

### ***Determinación de mercurio y selenio y sus especies en pescados de elevado consumo***

La exposición al mercurio presenta notables riesgos para la salud humana, debido a sus efectos teratogénicos, inmunotóxicos y especialmente neurotóxicos. Su carácter

lipofílico facilita su absorción en los tejidos grasos y por tanto su bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria, hecho que explica la elevada concentración de este compuesto en alimentos expuestos a bajos niveles de mercurio. Por ello, la continua monitorización de sus compuestos en alimentos se ha convertido en un aspecto de elevado interés en la comunidad científica actual.

La principal fuente de mercurio en la alimentación humana son los pescados, especialmente en países como España y Portugal, donde su consumo es muy elevado. Este hecho ha puesto de manifiesto la necesidad de valorar y controlar el riesgo de exposición humana a alimentos contaminados para poder cumplir con la legislación vigente en materia de seguridad alimentaria.

A pesar de las ventajas nutricionales que aporta el consumo de pescados, este puede constituir un riesgo por su conocida bioacumulación y transformación de especies de Hg. Por otra parte existen evidencias de que el Se presente en los pescados, aparte de ser un micronutriente esencial, podría contrarrestar el efecto tóxico del Hg. De hecho, en la bibliografía se han descrito mamíferos marinos y aves con valores de selenio y mercurio extremadamente altos, y a pesar de esto, no mostraron ningún signo de intoxicación. Esto sugiere que la presencia de ambos elementos puede proporcionar un efecto protector mutuo.

Aunque la evaluación del riesgo asociado a la exposición del hombre al mercurio es de elevada importancia, se deben evitar las alarmas infundadas a los consumidores, puesto que los pescados presentan un elevado valor nutricional y son necesarios para una dieta equilibrada. Por esto, se debe proporcionar una información clara, basada en la investigación, sobre las especies que presentan una relación riesgo-beneficio más favorable.

De acuerdo con la metodología y el plan de trabajo consignados en la memoria, el trabajo experimental ha tenido por objeto la evaluación de la exposición de las poblaciones españolas y portuguesas a estos compuestos en el marco de dos acciones integrada entre ambos países (HP2000-0049 y HP03-127).

Para evaluar la exposición de la población española y portuguesa al mercurio a través del consumo de pescado, se seleccionaron las especies más comúnmente consumidas, y se determinó la correlación Hg-Se. De esta forma puede valorarse no sólo el riesgo que supone su consumo, sino las especies de mayor interés desde un punto de vista toxicológico.

Una vez seleccionadas las variedades de interés, se aplicó la metodología analítica desarrollada para la separación, identificación y cuantificación de las especies de mercurio y selenio en los pescados.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que todos los pescados analizados cumplen la legislación comunitaria (European Commission Decision 466/2001 y

222/2002) en cuanto a los valores de mercurio total. Pero cabe destacar que el contenido total de mercurio en el pulpo ( $0.024 \mu\text{g g}^{-1}$ ), caballa ( $0.033 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y sardina ( $0.046 \mu\text{g g}^{-1}$ ) se encuentra muy por debajo de los contenidos del pez espada y el atún ( $0.31\text{-}0.43$  y  $0.42\text{-}0.47 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente).

Tal variabilidad se puede explicar por la interferencia de parámetros bióticos como la edad, tamaño, sexo, metabolismo y hábitos de alimentación que afectan al proceso de bioacumulación en los seres vivos. De hecho, el mercurio se biomagnifica en la cadena alimentaria acuática, por lo que los peces situados en un nivel trófico superior suelen tener niveles superiores de mercurio.

Análogamente se evaluó la concentración de selenio en las mismas muestras, aunque en este caso no se observó una variabilidad tan grande ( $0.13\text{-}0.92 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Por lo tanto, el pescado puede considerarse una buena fuente de selenio que podría contribuir substancialmente a proporcionar la cantidad diaria recomendada por la Organización Mundial de la Salud.

El conocimiento sobre las formas químicas en que se encuentra el mercurio y el selenio en los alimentos tiene gran interés, puesto que su toxicidad dependerá de las especies encontradas y de su concentración.

Los estudios de especiación de mercurio de las muestras de pescado, mediante el acoplamiento GC-pyro-AFS, previa extracción ácida, pusieron de manifiesto que más del 92% del mercurio total aparece en forma de MeHg, la única especie orgánica detectada, permaneciendo el resto en forma de mercurio inorgánico.

Teniendo en cuenta estos resultados y los contenidos de mercurio total comentados con anterioridad, el consumo del atún y el pez espada se encontraría fuertemente restringido según recomendaciones de la USEPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos).

Por otro lado, con el fin de evaluar la naturaleza de los selenocompuestos presentes, las muestras se sometieron a una extracción acuosa y se observó que sólo una fracción muy pequeña, entre un 3-10% del selenio total era soluble en agua. Posteriormente, tanto a la fracción soluble como al residuo sólido se aplicó un tratamiento de hidrólisis enzimático en dos etapas desarrollado previamente en el grupo de investigación, pero modificando la enzima utilizada. A continuación ambos extractos fueron procesados a través de filtros de corte de 10 kDa. De esta forma se pudo estudiar como la distribución de los compuestos de selenio variaba en función de la muestra analizada. En el caso del pez espada, se obtuvieron recuperaciones entre el 90-97%, lo que indica que el peso molecular de la mayoría de las especies de selenio es inferior a 10 kDa. Sin embargo, cuando se analizaron el atún y la sardina las recuperaciones fueron notablemente inferiores (45-75%), lo que implica que la enzima no resultó tan efectiva para



la ruptura de los péptidos o proteínas en fracciones de menor tamaño como ocurría con el pez espada, por lo tanto el selenio debe permanecer en parte en forma peptídica.

El análisis de ambas fracciones por HPLC-ICP-MS, bajo dos condiciones cromatográficas distintas permitió la identificación de una única especie de selenio, la SeMet. La SeMet es una de las especies que junto con la SeCys posee mayor importancia para la salud humana, puesto que presenta una elevada velocidad de absorción, mayor retención en tejidos y una máxima incorporación a enzimas y proteínas.

La concentración de SeMet varió dependiendo del tipo de pescado. El pez espada contenía un porcentaje de SeMet de 85 a 93% del selenio total se encontraba en forma de SeMet, sin embargo el atún y la sardina presentaron porcentajes inferiores (45-46% y 25-28% respectivamente).

La relación Se:Hg varió entre 3 (pez espada) y 22 (sardina). Además, la relación favorable encontrada entre MeHg y SeMet en la sardina (6.3), comparándola con la obtenida en el atún (3.8) o pez espada (2.7), pone de manifiesto su importancia nutricional desde el punto de vista toxicológico. Por ello, su consumo sería preferible frente al de los otros dos pescados estudiados.

Para establecer el balance correcto de mercurio y selenio, tanto en el hombre como en los animales, es necesario estimar la eficacia del aporte de estos elementos a través de la dieta. Para ello, no basta con determinar el contenido total, sino que es preciso conocer su biodisponibilidad, cantidad absorbida y utilizada por el organismo, ya que en la mayoría de los alimentos, sólo una parte es disponible. La biodisponibilidad de estos elementos implica no sólo su absorción en el intestino, sino también su conversión en una forma biológicamente activa.

La extensión de los efectos tóxicos causados por metales pesados no se debe exclusivamente a su concentración total, sino que viene regulado por la forma en que el metal interacciona eficientemente con ligandos biológicos. Por lo tanto, la biodisponibilidad dependerá de la posibilidad de las especies químicas de llegar a los lugares de absorción, principalmente el duodeno, para así cruzar la barrera intestinal. Estas formas químicas pueden existir originalmente en los alimentos o modificarse durante el proceso de digestión. Consecuentemente, sólo se absorbe y utiliza una proporción de estos alimentos.

La forma físico-química del elemento ingerido determinará por lo tanto la fracción absorbida del mismo, su grado de biodisponibilidad y sus vías metabólicas en el organismo.

El mercurio y el selenio son ejemplos de elementos consumidos en diferentes formas químicas, por lo que resulta necesario conocer tanto la biodisponibilidad como el metabolismo de estas formas. Por lo tanto, la especiación de los micronutrientes es

esencial tanto en los alimentos como en el tracto gastrointestinal para así entender y predecir la disponibilidad de absorción.

Con el fin de evaluar el porcentaje del nutriente transformado a una forma absorbible en el intestino se realizaron estudios de bioaccesibilidad *in vitro*, mediante la simulación de una digestión gastrointestinal.

Los estudios se llevaron a cabo sobre muestras de atún, pez espada y sardina y atún cocinado, para evaluar así el comportamiento de distintas especies de pescados de elevado consumo y el efecto que el proceso de cocinado ejerce sobre la bioaccesibilidad del mercurio y selenio. El contenido de mercurio y selenio de los extractos resultantes de la digestión estomacal e intestinal proporciona una medida de la fracción de Hg y Se bioaccesible.

Las recuperaciones obtenidas después de someter los alimentos a una digestión gástrica (pH=2.0) y gastrointestinal (pH=6.8) simulada permitieron concluir que la bioaccesibilidad del selenio depende del tipo de alimento. Entre un 47 y un 70% del selenio presente en los pescados fue bioaccesible en la digestión estomacal, mientras que a un pH neutro (jugo intestinal), la fracción bioaccesible osciló entre un 50 y un 83%.

En el caso del atún la solubilidad del selenio después de la digestión gástrica no difirió significativamente de la digestión gastrointestinal, sin embargo, la solubilidad del selenio en los sobrenadantes gastrointestinales en el caso de la sardina y pez espada fue un 17 y 60% superior respectivamente a los obtenidos en la digestión gástrica.

Si se comparan los distintos pescados se observa que la bioaccesibilidad del selenio es superior en el caso del pez espada y sardina (76 y 83% respectivamente) que en el atún (50%). Esto puede ser consecuencia o de la diferente composición de los pescados, puesto que tanto las proteínas como el contenido en grasas puede afectar a la solubilidad del selenio, o de la diferente capacidad de las enzimas del método *in vitro* desarrollado para liberar el selenio existente en cada muestra. En este caso la digestión gástrica empleada (pepsina /HCl) rompe las proteínas fundamentalmente en péptidos de menor peso molecular a través de la acción de proteinasas y peptidasas. La digestión intestinal a través de la pancreatina favorece la ruptura de los carbohidratos en monosacáridos y proteínas en péptidos. Finalmente, las sales biliares facilitan la digestión de las grasas debido a la formación de emulsiones.

En el caso del atún cocinado se observó que el selenio bioaccesible era ligeramente superior si se compara con el atún seco. Este hecho pone de manifiesto que el procesamiento de la muestra puede alterar la eficiencia con la que las enzimas digestivas liberan al selenio durante la digestión de los alimentos. Los procesos que involucran la aplicación de calor favorecen la pérdida de agua y vitaminas, además de la degradación de proteínas. De esta forma se puede favorecer la digestión de esas proteínas, lo que

facilitaría la liberación del selenio unido a proteínas, y consecuentemente, se incrementaría la bioaccesibilidad del mismo.

Cuando se realizan estudios de bioaccesibilidad no debe olvidarse la posibilidad de transformación que los procesos de digestión pueden ocasionar en las especies de selenio presentes en los alimentos. Para evaluar esta posibilidad se realizó la especiación de Se en los extractos gastrointestinales. Además, para poder dilucidar si el efecto del cocinado produce alguna diferencia potencial en la asimilación de selenio en los humanos se analizaron igualmente el atún seco y el cocinado.

Los estudios de especiación sobre los extractos gástrico y gastrointestinal pusieron de manifiesto que la SeMet fue la especie predominante de selenio encontrada en el atún en ambos extractos. El cromatograma obtenido era análogo al que se obtuvo cuando se aplicó un proceso de hidrólisis enzimática con la enzima *Streptomyces griseus*. Sin embargo, los extractos del pez espada y la sardina presentaron un pico mayoritario adicional además del pico correspondiente a la SeMet.

Asimismo se obtuvieron cromatogramas similares para los dos tipos de atún analizados, por lo que se puede concluir que el proceso de cocinado no modifica ni la integridad ni el contenido del selenoaminoácido SeMet.

Los resultados derivados de la cuantificación de la SeMet permiten concluir que la cantidad de SeMet varía dependiendo de la especie de pescado analizado. El atún y la sardina mostraron una mayor concentración de SeMet bioaccesible ( $0.245\text{-}0.290\ \mu\text{g g}^{-1}$ ) que el pez espada ( $0.147\ \mu\text{g g}^{-1}$ ), a pesar de que este último mostró un mayor contenido en SeMet cuando se realizaba la hidrólisis enzimática.

A diferencia de lo que ocurría con el empleo de la enzima Pronasa (contenido de SeMet varió en función del pescado), en la digestión *in vitro* todos los pescados analizados proporcionaron el mismo porcentaje de SeMet bioaccesible, a pesar de que la bioaccesibilidad del selenio total varió en función de la especie animal. Por lo tanto, cabe concluir que la SeMet biodisponible debe estar localizada en proteínas de naturaleza y accesibilidad similar.

Paralelamente se evaluó la bioaccesibilidad del mercurio. Las recuperaciones del mercurio endógeno en los sobrenadantes gástrico y gastrointestinal nuevamente variaron en función del tipo de muestra, como consecuencia de la diferencia de composición de los pescados estudiados. Los resultados obtenidos mostraron que entre un 9 y un 20% del mercurio total se convertía en bioaccesible después de una digestión estomacal, y entre un 9 y un 17% después de simular la digestión intestinal, siendo en el pez espada donde el mercurio se mostró más bioaccesible. Estos resultados resultan contradictorios si se compara con los derivados de experimentos con animales suplementados con MeHg, en donde se observa una elevada absorción. Las bajas recuperaciones obtenidas pueden atribuirse a la poca capacidad de las enzimas del método *in vitro* desarrollado para liberar

el Hg existente, más que a la baja bioaccesibilidad del MeHg. De hecho, se obtuvo una recuperación del 89% cuando se aplicó el mismo tratamiento a un patrón de MeHg.

La solubilidad del mercurio en la digestión gástrica difirió significativamente de la digestión gastrointestinal, puesto que la solubilidad gastrointestinal fue 40% inferior para el atún y 54% y 22% superior para el pez espada y la sardina.

Para evaluar las posibles transformaciones de las especies de mercurio, principalmente MeHg, presente en el producto inicial, una vez simulada la digestión gastrointestinal se procedió a la especiación en los extractos. Los resultados mostraron que el mercurio bioaccesible no se transformó a mercurio inorgánico, sino que permaneció en forma de mercurio orgánico.

Una vez determinado el contenido de mercurio y selenio bioaccesible, y su especiación se determinaron las relaciones molares Se:Hg,  $[\text{Se:Hg}]_{\text{bioaccesible}}$ , y  $[\text{SeMet:MeHg}]_{\text{bioaccesible}}$ . Éstas mostraron el mismo orden: sardina>atún>pez espada. Como consecuencia el pescado más favorable para el consumo puede predecirse calculando la relación molar Se:Hg. En este caso se prefiere el consumo de la sardina frente al consumo de las otras dos especies.

### ***Efecto del enriquecimiento de piensos con selenio y arcillas en la acumulación, distribución y transformación del mercurio***

En la actualidad se ha de tener en cuenta que además del consumo directo de pescado en la alimentación animal se emplean productos derivados de la pesca debido a su elevado contenido en minerales y a que proporcionan una fuente rica de proteínas. De hecho, la utilización de harinas de pescado en la crianza de aves ha supuesto una serie de ventajas entre las que destacan un rápido crecimiento, una mejor conversión del alimento, incremento de la inmunidad y mejor desarrollo del sistema nervioso y estructura ósea.

El empleo de piensos que contengan harinas de pescado puede originar niveles de mercurio no deseados, puesto que incluso bajos niveles de mercurio pueden causar su acumulación por encima del límite permitido en la mayoría de los países para alimentos no derivados de la pesca. Por lo tanto, la carne procedente de animales alimentados con productos derivados de la pesca podría contribuir a la exposición del hombre al mercurio.

Como consecuencia del aumento considerable de la presencia de mercurio que están experimentando los productos de consumo animal se nos propuso formar parte de un proyecto de investigación en colaboración con la empresa Nanta. El proyecto consistió en establecer posibles formas de reducir la toxicidad del mercurio. Para ello se suplementaron en la dieta materiales adsorbentes no nutritivos capaces de unirse al

mercurio y reducir así su absorción en el tracto gastrointestinal o agentes antagonistas del efecto tóxico del mercurio, como es el selenio.

Las arcillas seleccionadas en este estudio (bentonita y sepiolita) presentan unas características físico-químicas especiales como elevada área superficial, elevada capacidad de intercambio catiónico y estabilidad química. Además, se ha demostrado que su administración a animales de experimentación reduce el efecto tóxico de algunos compuestos como las aflatoxinas.

Por otro lado, el selenio ha sido considerado como un antagonista potencial de la toxicidad del mercurio, por lo que conjuntamente con las arcillas se propuso su utilización para paliar los efectos negativos del mercurio y clarificar los posibles mecanismos de interacción entre el mercurio y el selenio.

El estudio se realizó con una población de 160 pollos (Hybro-G) de un día de edad, y fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 8 individuos para su posterior tratamiento.

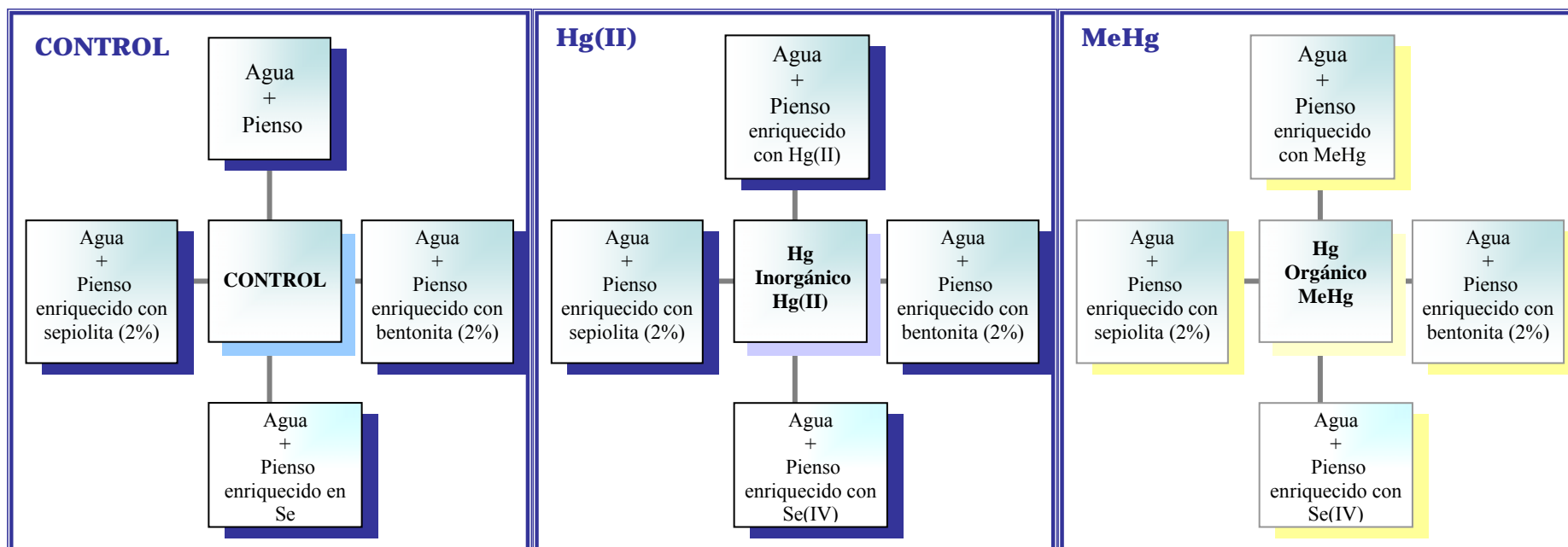
Durante los 42 días que duró el estudio los pollos fueron alimentados con una dieta basal (control) o con una dieta suplementada con diferentes compuestos: Hg(II), MeHg, Se(IV), sepiolita o bentonita (12 tratamientos diferentes). De esta forma se podría evaluar, por una parte la distribución del mercurio y posible modificación de los niveles basales de Se, y por el otro, el efecto que el Se, la bentonita y la sepiolita ejercían sobre la distribución y bioacumulación del mercurio. En la figura 8, se esquematiza los tratamientos utilizados en el estudio.

Durante los 3 primeros días se les administró luz de forma continuada, después fue programado un intervalo de 20 h de luz y 4 h de oscuridad al día. La dieta y el agua fueron administrados *ad libitum*.

Para determinar la ganancia de peso y la eficiencia del alimento, los animales se pesaron a los 0, 21 y 42 días de estudio. No se observaron diferencias significativas en la ingesta del pienso, ni en la ganancia de peso en ninguno de los tratamientos experimentales. Por lo tanto, la adición de Hg(II), MeHg, Se, bentonita y sepiolita no afectaron a la ingesta y conversión del alimento.

A los 42 días los animales fueron sacrificados y se seleccionaron sus hígados, riñones, músculo y piel, los cuales se almacenaron individualmente a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Con el fin de evaluar las posibles diferencias en el proceso de acumulación del mercurio y selenio dependiendo del tejido y de la especie de mercurio administradas se determinó el contenido de mercurio y selenio total de los pollos control y de los pollos alimentados con Hg(II) y MeHg mediante las técnicas de CV-AFS y HG-AFS.



**Figura 8.** Esquema de los tratamientos experimentales utilizados

Los resultados mostraron que tanto su acumulación como su distribución dependió de la forma química administrada, a pesar de que ambas dietas tenían el mismo contenido de mercurio total ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). La administración de mercurio inorgánico y orgánico condujo a valores de acumulación de  $11.3 \text{ }\mu\text{g}$  y  $180.4 \text{ }\mu\text{g}$ , respectivamente. Por lo tanto, el MeHg mostró una mayor biodisponibilidad (21%) que el mercurio inorgánico (1.3%). Además, se observó que en ambos casos el músculo fue el órgano donde se concentró la mayor cantidad de mercurio, pasando a ser este órgano una gran reserva del elemento, a pesar de ser el riñón y el hígado los órganos diana bajo los tratamientos de Hg(II) y MeHg, respectivamente.

El grupo control al que no se le adicionó mercurio no mostró ninguna evidencia de contaminación.

La administración de Se a través del pienso condujo a valores de acumulación de  $365 \text{ }\mu\text{g}$  de selenio total y  $168 \text{ }\mu\text{g}$  de SeMet, bioacumulándose un 12% de Se total y un 5.6% de SeMet. Además, se observó que el músculo fue el órgano donde mayor cantidad de selenio se concentró, constituyendo una gran reserva del elemento, aunque el riñón y el hígado fueron los órganos diana para el Se total y la SeMet respectivamente.

La administración conjunta de Se(IV) y Hg(II) supuso la disminución de la acumulación del mercurio en todos los órganos del pollo estudiados (entre un 60 y un 100%), pero el riñón permaneció como el órgano diana. Además, se observó una variación en su distribución, lo que hace suponer que la protección ejercida por parte del selenio debe involucrar algún tipo de cambio en la distribución del mercurio a un nivel subcelular. Consecuentemente, la adición de selenio produjo una reducción en la acumulación del mercurio y promovió la redistribución del mercurio desde órganos más sensibles (riñón e hígado) a menos sensibles (músculo). Por lo tanto, el selenio influye en la acumulación del mercurio en los tejidos a través de mecanismos específicos en cada tejido.

Así mismo, la presencia de mercurio inorgánico no modificó significativamente los niveles endógenos de selenio en el hígado, músculo y piel, sin embargo sí afectó a su acumulación en el riñón. Por otra parte, la adición del selenio a la dieta que contenía Hg(II) sí disminuyó la bioacumulación del primero en todos los tejidos.

Como se ha comentado anteriormente el pienso suministrado a los pollos contiene aproximadamente un 90% del contenido de selenio en forma de SeMet. Una posible interacción entre la SeMet del pienso y el Hg(II) y el Se(IV) adicionados puede explicar las diferencias encontradas en la bioacumulación del selenio entre los dos tratamientos (Hg y Hg + Se).

A diferencia de lo observado en el caso del mercurio, la distribución del selenio permanece inalterada tanto en el grupo control, como en el grupo de Hg(II) y el grupo (Hg(II)+ Se). Por lo tanto, el mercurio inorgánico inhibió la absorción del selenio sin alterar su distribución.

Los resultados obtenidos cuando se co-administraron Se(IV) y MeHg mostraron que la acumulación del metilmercurio no experimentaba las mismas variaciones que con el mercurio inorgánico. La acumulación del mercurio orgánico en el riñón no se vio modificada, pero sí su acumulación en el hígado, músculo y piel, alcanzando así el músculo los niveles de mercurio total que se encontraban en el riñón en ausencia de selenio, y triplicando su concentración el hígado.

A pesar del aumento del mercurio total en el hígado, sin embargo se observó, una vez realizados los estudios de especiación, que la proporción de MeHg había disminuido. Esto implica que la presencia de Se favorece la demetilación del mercurio en un 145-280%.

Aunque se han llevado a cabo un gran número de estudios, los mecanismos de interacción MeHg-Se aún no están muy establecidos. Se sabe que el Se reduce la secreción biliar del MeHg. Como consecuencia, un proceso de excreción biliar lento retrasaría la eliminación del metal del cuerpo del animal y se favorecería así su acumulación y detoxificación en el hígado.

La presencia del MeHg no modificó significativamente los niveles basales de Se en el pollo. Sin embargo la co-administración de Se(IV) en la dieta no afectó a la acumulación del mismo en el músculo, el riñón y la piel, pero sí incrementó su nivel en el hígado. A diferencia de lo que ocurría con el mercurio inorgánico la distribución del selenio sí se vio afectada cuando se adicionaron al pienso MeHg o MeHg y Se. De hecho, el MeHg favoreció la redistribución del Se del músculo al hígado, corroborando que en este órgano interaccionan ambos elementos cuando se administran simultáneamente.

Estos resultados enfatizan la relación entre el Se y Hg, aunque el mecanismo por el cual el metabolismo del Hg en animales es modificado es bastante complejo y no se comprende en su totalidad.

El empleo de las arcillas (bentonita y sepiolita) disminuyó la bioacumulación de mercurio inorgánico en todos los tejidos (64-100%), obteniéndose mejores resultados con el empleo de la bentonita. Sin embargo, la presencia de estas arcillas en la dieta también disminuye considerablemente el contenido basal de Se en los cuatro tejidos estudiados, aunque el orden de acumulación permanece inalterado.

Consecuentemente, se puede concluir que ambas arcillas pueden disminuir en gran medida la acumulación del mercurio inorgánico en pollos, por lo que podrían emplearse en la dieta de animales como protectores del efecto tóxico del mercurio.

Con respecto al MeHg, los resultados muestran una interacción significativa entre la bentonita y el MeHg en el riñón y el músculo, donde el contenido de mercurio se redujo un 67 y un 29% respectivamente, mientras que el mercurio en el hígado permaneció inalterado.



Por otra parte, la adición de sepiolita no afectó a la acumulación de mercurio orgánico en los riñones, pero sí en el hígado, músculo y piel, permaneciendo el hígado como órgano diana. La concentración de mercurio total en estos tejidos superó la encontrada en ausencia de sepiolita. Consecuentemente, la inclusión de sepiolita parece causar un efecto similar en la acumulación del MeHg al indicado previamente para el selenio.

Con vista de estos resultados, el empleo de bentonita en la dieta de las aves puede ser beneficioso en el caso de que los animales consuman alimentos contaminados indistintamente con MeHg o Hg(II).

En un intento por clarificar el metabolismo del mercurio en aves y elucidar el mecanismo de interacción entre el mercurio y el selenio se estudió la distribución de las especies solubles de ambos elementos presentes en la fracción proteica de los hígados de pollo. El estudio se realizó mediante la aplicación de cromatografía de exclusión molecular (SEC) con detección UV e ICP-MS.

El mercurio y el selenio pueden modificar su metabolismo, magnificando o reduciendo sus efectos debido a las interacciones entre estas especies y otros elementos presentes en el individuo. De hecho, los desequilibrios de los elementos esenciales causados por los metales pesados a menudo inducen a una disfunción de órganos y tejidos. Por ello, para poder dilucidar los mecanismos que controlan la asimilación del mercurio y selenio y los procesos de transporte, metabolismo y detoxificación, se requiere información no sólo de estos elementos, sino de otros elementos traza con funciones específicas en la célula. Consecuentemente, para estudiar estos efectos se realizó una detección multielemental.

La extracción de las proteínas se llevó a cabo en un medio regulado (25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH=7.5) y con la ayuda de un Potter para favorecer así la ruptura de las células y la extracción de las proteínas. Para la separación de las mismas se seleccionó una columna de exclusión molecular con el intervalo de separación comprendido entre 300-1 kDa y se evaluó el efecto de distintas variables, tales como: pH, fuerza iónica, concentración de la fase móvil y caudal, sobre la separación de proteínas de peso molecular conocido. La mejor resolución cromatográfica se consiguió utilizando como fase móvil Tris-HCl 25 mM (KCl 50 mM, pH=6.8, 1 ml min<sup>-1</sup>). La detección se realizó mediante el acoplamiento de SEC a UV e ICP-MS.

Los elementos estudiados fueron Hg, Se, S, P, Cr, Co, As, Cd, Cu, Zn, Mn y Fe. Los resultados obtenidos mostraron contenidos totales y porcentajes de extracción (32-70%) dependientes del metal estudiado. En el citosol se encontraron los mismos porcentajes (>65%) de Co, Zn y As. En el caso del Mn, Cu, Cd y Fe estos aparecen distribuidos entre la fracción citosólica y el residuo (51-57%), mientras que el Cr y Se (33-

32%) no aparecen mayoritariamente en el citosol, sino que probablemente están enlazados a las membranas celulares o al núcleo, y por lo tanto, no pudieron ser extraídos con este procedimiento.

El azufre se distribuyó fundamentalmente asociado a compuestos de alto y medio peso molecular (>300-45 kDa) y bajo peso molecular (2.2 kDa). La detección de este elemento es un indicador de las proteínas (aminoácidos que contienen azufre), por lo que su perfil cromatográfico fue muy similar al obtenido por UV.

La monitorización del fósforo condujo a un pico mayoritario en la zona de bajos pesos moleculares (5.5 kDa), precedido por un pico muy pequeño correspondiente a compuestos de peso molecular superiores a 300 kDa.

El Cu, Zn y Fe se encontraron asociados fundamentalmente a especies de alto y medio peso molecular (>300-45 kDa). En este sentido, la existencia de fracciones de un mismo tamaño con distintos metales indica la presencia de proteínas con varios metales asociados a su estructura.

Los compuestos de selenio aparecen asociados a compuestos con un peso molecular comprendido entre 190 y 2.3 kDa.

El estudio de la distribución de los compuestos de selenio en la fracción soluble de los hígados de pollos control sugiere que las principales formas en las que se encuentra el selenio es constituyendo selenoproteínas específicas, y sólo una fracción muy pequeña del selenio soluble se encuentra en forma de selenometionina.

Una vez establecidas las características de los hígados de pollo del grupo control se llevó a cabo el mismo estudio en hígados de los pollos que habían sido sometidos a los tratamientos anteriormente mencionados: Hg(II), Hg(II)+ Se, MeHg y MeHg + Se.

Los porcentajes de recuperación del mercurio fueron del 57-90% en función de la especie de mercurio empleada. El mercurio inorgánico mostró una elevada eficiencia de extracción (90%) mientras que el MeHg se distribuyó equitativamente entre el citosol y el residuo, por lo que ambas especies mostraron una distribución subcelular diferente.

La exposición prolongada a Se(IV) no modificó la distribución subcelular del mercurio inorgánico, pero sí la del mercurio orgánico. La co-administración de MeHg y selenito sódico causó una disminución en el porcentaje de Hg encontrada en el citosol, lo que implica que la interacción mercurio orgánico-selenio favorece un incremento del primero en la fracción nuclear/mitocondrial.

Los cromatogramas obtenidos se asemejaron a los cromatogramas obtenidos en UV y los cromatogramas del azufre, lo que sugiere que el Hg se une a grupos sulfhidrilo y se enlaza así a proteínas. El mercurio aparece fundamentalmente asociado a proteínas de peso molecular alto y medio, con un pico mayoritario en la región de los 45 kDa que constituye aproximadamente el 50% del mercurio extraído.

La adición de selenio a la dieta que contenía mercurio inorgánico no afectó a los perfiles cromatográficos del mercurio, aunque sí varió la intensidad de los picos. Por otro lado, la adición de Se a la dieta que contenía MeHg originó importantes cambios en la distribución del mercurio. La adición conjunta de Se(IV) y MeHg favoreció la formación de nuevas especies moleculares de mercurio de 1 kDa de peso molecular y además un desplazamiento hacia las masas de mayor peso molecular. Este efecto sólo se observó cuando se administraron conjuntamente MeHg y selenito, lo que corrobora, como se ha comentado anteriormente, la interacción mercurio-selenio que ocurre en este órgano.

Con respecto a los porcentajes de recuperación de selenio obtenidos en todos los casos la presencia del mercurio no causó ningún efecto relevante. En todas las muestras analizadas se recuperó el 30% del selenio total.

La distribución del selenio apenas se vio modificada con la adición a la dieta de Hg(II) o Hg(II)+ Se(IV), sin embargo, la presencia de MeHg favoreció la formación de especies de selenio de elevado peso molecular. Además, cuando se co-administraron conjuntamente Se y MeHg no sólo se vio favorecida la formación de especies de selenio de alto peso molecular, sino que apareció un nuevo pico (30% del Se) con un tamaño aproximado 2 kDa. Esto corrobora la interacción mercurio-selenio en el hígado a nivel subcelular sugerida con anterioridad.

Por lo tanto, este estudio proporciona información sobre la distribución del Hg y Se en hígado de pollo después de ser sometidos a diferentes tratamientos, enfatizando la relación entre el mercurio y el selenio. Pero aún se requieren estudios que involucren el empleo de técnicas complementarias para así intentar identificar estas especies y comprender así su metabolismo.

Los tratamientos que involucraron el mercurio inorgánico no afectaron a la concentración y distribución multielemental estudiada, indicando que la adición de Hg(II) no supuso ningún efecto adverso en la concentración de los elementos traza al igual que en la distribución de sus especies. Mientras, los tratamientos con el mercurio orgánico sí modificaron la distribución del zinc. Las especies de Zn asociadas a altos pesos moleculares (>300-45 kDa) varían del 36% (hígado control) al 48% (MeHg) y 56% (MeHg + Se). El MeHg redistribuye el Zn apareciendo nuevas especies de elevado peso molecular. De hecho, un pico desaparece (100 kDa) y aparece un nuevo pico a 80 kDa.

Los resultados experimentales derivados de este estudio constituyen una importante aportación dado el estado actual del conocimiento, puesto que se inicia el camino hacia la identificación y caracterización de las biomoléculas de mercurio y selenio. Además, constituye el comienzo de una investigación que requiere procesos previos de purificación con el fin de llevar a cabo su elucidación estructural y el establecimiento de su función biológica.

# Conclusiones

## CONCLUSIONES

A lo largo de la investigación recogida en esta memoria, se han cubierto los objetivos propuestos al inicio del trabajo. Las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

➤ El método analítico desarrollado basado en el secado previo de la muestra en estufa y el empleo posterior de HCl como medio extractante permite la extracción de las especies de mercurio presentes en muestras biológicas de forma cuantitativa, manteniendo su integridad durante todo el proceso de extracción. Además, se ha demostrado que los extractos ácidos son estables durante una semana, no produciéndose variaciones en la concentración de mercurio total. Como consecuencia, es posible el almacenamiento de los extractos durante el periodo mencionado, evitándose la necesidad del análisis inmediato.

El método ha sido aplicado satisfactoriamente para la determinación de las especies de mercurio en pescados, y validado mediante su aplicación a un material de referencia. La metodología desarrollada permite la determinación de las especies de mercurio sin necesidad de emplear procedimientos más laboriosos como derivatización por etilación.

➤ El empleo del microondas o liofilización como procedimientos alternativos de secado de muestra, y el extractante TMAH puede conducir a errores en la determinación de las especies de Hg por pérdidas de las especies volátiles o formación artificial de dimetilmercurio, respectivamente.

➤ El método desarrollado basado en la combinación de la energía procedente de una sonda de ultrasonidos y un tratamiento enzimático permite la extracción del contenido total de selenio y sus especies en muestras biológicas en un tiempo muy inferior al requerido por otros procedimientos, sin que se originen pérdidas ni transformaciones de las especies químicas estudiadas. Este método de extracción ha sido aplicado satisfactoriamente a muestras de origen vegetal y animal y se caracteriza por el bajo consumo de reactivos, la simplicidad y seguridad del procedimiento.

➤ La determinación de Hg total y sus especies en pescados de elevado consumo en España y Portugal pone de manifiesto que los pescados seleccionados tienen la habilidad de acumular elevadas concentraciones de Hg, fundamentalmente MeHg. Este hecho merece especial atención debido al elevado valor nutricional de este alimento, necesario en una dieta equilibrada. Por ello, se establece la necesidad de monitorizar los

compuestos de Hg en alimentos para evitar así posibles riesgos para la salud. Por otra parte, la determinación de las especies de Se en dichas muestras, mediante HPLC-ICP-MS puso de manifiesto que la SeMet es la especie mayoritaria en todas las fracciones analizadas, variando su contenido según el tipo de pescado.

➤ Estudios de bioaccesibilidad de Hg y Se llevados a cabo mediante la simulación de una digestión gastrointestinal *in vitro* demostraron que ésta depende del tipo de muestra analizada, excepto en el caso de la SeMet, lo que implica que esta especie se encuentra presente en los pescados en proteínas de la misma naturaleza. Las especies de Hg y Se permanecen inalteradas durante todo el proceso de digestión, resultando más disponible las especies de Se.

➤ El pescado más recomendable para el consumo humano puede predecirse calculando la relación molar Se:Hg. De todos los pescados estudiados la sardina ha resultado ser la especie más idónea.

➤ El enriquecimiento de piensos con un agente antagonista del efecto tóxico del Hg (Se) y con materiales adsorbentes (bentonita y sepiolita) ha resultado ser adecuado para reducir la toxicidad del Hg inorgánico en aves. Además, el empleo de bentonita en la dieta puede ser beneficioso en caso de que los animales consuman alimentos contaminados con MeHg, ya que disminuye su acumulación.

➤ La cuantificación, especiación y distribución de los compuestos de Hg y Se, pone de manifiesto la biotransformación de ambos elementos, así como el antagonismo ejercido por el Se como resultado de su interacción con el Hg cuando se administran simultáneamente en aves.

➤ Se ha demostrado, asimismo, que la interacción Hg-Se depende no sólo de la forma química en la que está presente, sino del órgano implicado. Entre todos los órganos estudiados el hígado está implicado directamente en los procesos de detoxificación.

# Anexo

---

**GLOSARIO DE TÉRMINOS**

<b>AAS</b>	Espectroscopía de absorción atómica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AES</b>	Espectroscopía de emisión atómica
<b>AFS</b>	Espectroscopía de fluorescencia atómica
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASE</b>	Extracción con disolventes acelerada
<b>BDDA</b>	Bromuro de didodecildimetilamonio
<b>CAR</b>	Carboxeno
<b>CE</b>	Electroforesis capilar
<b>CRM</b>	Material de referencia certificado
<b>CT</b>	Atrapamiento criogénico
<b>CV</b>	Vapor frío
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DESe</b>	Dietilselenio
<b>DIN</b>	Nebulizador de inyección directa
<b>DMDSe</b>	Dimetildiselenio
<b>DMSe</b>	Dimetilselenio
<b>DOC</b>	Materia orgánica disuelta
<b>DVB</b>	Divinil-benceno
<b>ECD</b>	Captura electrónica
<b>ESMS</b>	Espectrometría de masas con electrospray
<b>ETAAS</b>	Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito
<b>EtHg</b>	Etilmercurio
<b>FAAS</b>	Espectroscopía de absorción atómica con llama
<b>FI</b>	Inyección en flujo
<b>FID</b>	Detector de ionización en llama
<b>FTIR</b>	Transformada de Fourier
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GPX</b>	Glutadiona peroxidasa
<b>GPX1</b>	Glutadiona peroxidasa celular, clásica o citosólica
<b>GPX2</b>	Glutadiona peroxidasa gastrointestinal
<b>GPX3</b>	Glutadiona peroxidasa plasmática
<b>GPX4</b>	Fosfolípido hidroxiperoxidasa
<b>GSSeSG,</b>	Intermedios metabólicos del selenio ingerido con la glutadiona
<b>GSSeH</b>	peroxidasa



<b>HG</b>	Generación de hidruros
<b>HHPN</b>	Nebulizador hidráulico de alta presión
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>HS</b>	Espacio de cabeza
<b>ICP</b>	Plasma de acoplamiento inductivo
<b>ICP-AES</b>	Espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
<b>L. D.</b>	Límite de detección
<b>LC</b>	Cromatografía de líquidos
<b>Lys</b>	Lisina
<b>Me<sub>2</sub>Hg</b>	Dimetilmercurio
<b>MeHg</b>	Metilmercurio
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MIP</b>	Plasma inducido por microondas
<b>MIP-AES</b>	Plasma inducido por microondas-Espectroscopía de emisión atómica
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>MW</b>	Microondas
<b>NaBEt<sub>4</sub></b>	Tetraetilborato de sodio
<b>OCN</b>	Nebulizador de capilar oscilante
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PrSeCys<sub>2</sub></b>	Propil-selenocistina
<b>Rfd</b>	Dosis de referencia
<b>RP</b>	Fase reversa
<b>SBM</b>	Seleniuro bis(metilmercúrico)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular
<b>SeCys</b>	Selenocisteína
<b>SeCys<sub>2</sub></b>	Selenocistina
<b>SeEt</b>	Selenoetionina
<b>SeMet</b>	Selenometionina
<b>SeOMet</b>	Óxido de la selenometionina
<b>SeUr</b>	Selenourea
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SPME</b>	Microextracción fase sólida
<b>tARN</b>	Ácido desoxirribonucleico translacional o de transporte
<b>TMAH</b>	Hidróxido de tetrametilamonio
<b>TMSe<sup>+</sup></b>	Ion trimetilselenonio

<b>TRIS</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>UGA</b>	Triplete de bases uracilo-guanosima-adenina
<b>US-EPA</b>	Agencia Americana para la protección del Medio Ambiente
<b>USN</b>	Nebulización ultrasónica
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Uv-Vis</b>	Ultravioleta-visible
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana