

DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO Y MERCURIO EN PESCADOS DE ELEVADO CONSUMO MEDIANTE HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS

Tamara Fernández-Bautista, Beatriz Gómez-Gómez, Emma Gracia-Lor, Teresa Pérez-Corona, Yolanda Madrid

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica
Av. Complutense, s/n, 28040, Madrid, tamarf02@ucm.es, ymadrid@ucm.es

1. INTRODUCCIÓN

El acceso a una alimentación saludable es uno de los principales objetivos que debe plantearse la sociedad actual, sobre todo desde un punto de vista de seguridad alimentaria y sostenibilidad.

El pescado posee un elevado valor nutricional ya que no solo representa una fuente importante de proteínas, vitaminas y elementos traza esenciales, sino que también forma parte de una dieta equilibrada.

Elementos tóxicos como el mercurio (Hg) pueden estar presentes de forma natural y acumularse en cantidades elevadas en ciertas especies de peces, sobre todo en los que se encuentran en los niveles más altos de la cadena trófica, es decir, en especies depredadoras. El mercurio ha sido reconocido como uno de los principales problemas de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1, 2]. Su significado biológico se limita a su toxicidad, la cual depende en gran medida de la dosis ingerida, así como de la forma química en la que se encuentre el elemento. Las formas metiladas (especies orgánicas) de Hg, como el metilmercurio (MeHg), son potentes neurotóxicos. La principal fuente de exposición de MeHg para humanos es la ingesta de pescado. El Hg es emitido al medio ambiente como consecuencia de actividades tanto naturales (actividades geotérmicas o liberación de rocas y sedimentos) como antropogénicas (minería, combustibles fósiles o producción de metales) [3] y acaba depositándose en ríos y mares, bioacumulándose en los peces y, por tanto, suponiendo un riesgo potencial para el consumo humano [4].

El selenio (Se) es un elemento esencial ya que interviene en las proteínas como el 21^o aminoácido (selenocisteína). Es un potente agente antioxidante y presenta además propiedades anticarcinogénicas. Está presente de manera natural en los pescados en forma de seleno aminoácidos, como la selenocisteína (SeCys) y la selenometionina (SeMet) [5]. En últimos años se le ha reconocido un efecto protector frente a la toxicidad del mercurio.

Aunque los mecanismos de la interacción Se-Hg no están todavía completamente elucidados, se sabe que la toxicidad del MeHg tiene lugar a través de la alteración del metabolismo del Se, más concretamente en la disrupción de la síntesis de selenoproteínas [6]. Cuando dicha interacción sucede, debido a la elevada afinidad que presenta el Hg por el Se ($k_a=10^{45}$), se forman complejos de MeHg-SeCys, quedando parte del Se

secuestrado por el Hg y, por tanto, disminuyendo su biodisponibilidad y, como consecuencia, las selenoenzimas y la actividad antioxidante. Además, fruto de la interacción también se forman compuestos insolubles de seleniuro de Hg [5], viéndose disminuida la toxicidad del Hg en el organismo, e incluso promoviendo la demetilación del MeHg y produciéndose una redistribución del tóxico a órganos menos sensibles [7].

En esta línea, en el presente trabajo se llevaron a cabo estudios de especiación de Se y Hg en el músculo de pescados de elevado consumo. Además, con el fin de evaluar la disponibilidad del Se una vez producida su interacción con el Hg, se calcularon los valores de Health Benefit Value (HBV_{Se}) a partir de las relaciones molares de Se y Hg medidas en las muestras de interés.

Esta temática forma parte de las líneas de investigación del grupo de Determinación de Trazas, Especiación y Proteómica (TrEP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) sobre el desarrollo de metodologías analíticas para la especiación de elementos traza y análisis de nanopartículas en muestras biológicas, alimentos y medioambientales.

2. METODOLOGÍAS Y RESULTADOS

Las muestras consideradas en este estudio son el músculo (parte comestible) de pescados frecuentemente consumidos, adquiridos en un supermercado local y almacenados a -20°C hasta su análisis. Las especies de pescado son el atún (*Thunnus*), el pez espada (*Xiphias gladius*), el salmón de piscifactoría (*Salmo salar*) y el salmón salvaje (*Oncorhynchus gorbuscha*).

2.1. Determinación del contenido total de Se y Hg en pescados. Cálculo de HBV_{Se}

La determinación del contenido total de Se en el músculo de los pescados se llevó a cabo por ICP-MS (Agilent 7700x) previa digestión ácida de la muestra en un horno microondas. Para la determinación del contenido total de Hg se utilizó el Analizador Directo de mercurio (DMA-80 evo, Milestone), sin previo tratamiento de muestra.

Se calcularon los límites de cuantificación para cada método mediante el análisis de 10 réplicas de un blanco y aplicando el criterio $10*SD$, obteniendo LOQ (Hg) = 0.033 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and LOQ (Se) = 0.006 mg kg^{-1} , respectivamente. Para validar los resultados obtenidos

en las determinaciones de Se y Hg total, se llevó a cabo el análisis de Materiales de Referencia Certificados del Instituto de Materiales de Referencia. El material ERM-CE 278k (muestra de mejillón) se utilizó para validar los resultados de la concentración de Se y Hg total. Además, para Hg total se utilizó también el material BCR-710 (muestra de ostra).

Una vez obtenidas las concentraciones totales de Se y Hg, se calculó el parámetro Health Benefit Value (HBV_{Se}) para cada muestra (Tabla 1). Este parámetro es un índice que representa la cantidad de Se que queda disponible una vez que se produce su interacción con el Hg, donde parte del Se es secuestrado por el Hg. HBV_{Se} fue calculado utilizando la ecuación (1) [6]:

$$HBV_{Se} = \frac{(Se-Hg)}{Se} (Se + Hg) \quad (1)$$

Se = contenido de Se en concentración molar ($mmol\ Se\ kg^{-1}$)
 Hg = contenido de Hg en concentración molar ($mmol\ Hg\ kg^{-1}$)

Valores positivos de HBV_{Se} indican que el consumo del pescado aparentemente no conlleva riesgos. Sin embargo, valores negativos suponen un riesgo potencial para el consumidor. Se sabe que el Se disminuye la toxicidad del Hg y, por tanto, los valores de HBV_{Se} . Este índice proporcionan una información más adecuada y realista que la proporcionada por los contenidos totales de cada elemento por separado. En consecuencia, estos datos son indispensables para una correcta evaluación de la seguridad relacionada con la exposición al mercurio por el consumo de este tipo de alimentos.

Tabla 1. Concentraciones de Se y Hg total obtenidas por ICP-MS y DMA, respectivamente. Cálculo de HBV_{Se} .

Pescado	[Se] ($mg\ kg^{-1}$)	[Hg] ($mg\ kg^{-1}$)	HBV_{Se}
Atún	1.6 ± 0.1	0.75 ± 0.03	0.0196
Pez espada	1.4 ± 0.2	0.23 ± 0.04	0.0174
Salmón de piscifactoría	1.03 ± 0.07	0.022 ± 0.002	0.0131
Salmón salvaje	0.74 ± 0.08	0.026 ± 0.003	0.0094

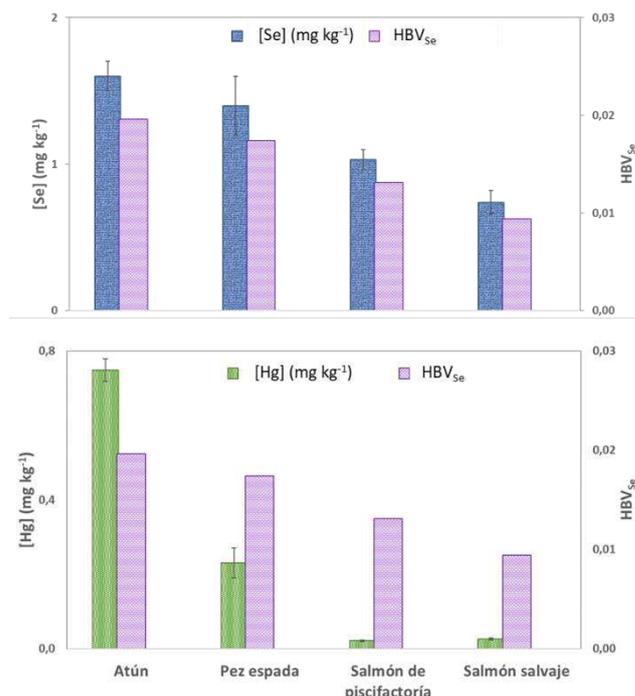


Figura 1. Contenidos totales de Se y Hg (eje Y izquierdo) y HBV_{Se} (eje Y derecho). Las barras de error en los contenidos totales de Se y Hg representan los valores de desviaciones estándar ($n=3$). Los valores de HBV_{Se} fueron calculados a partir de los valores medios.

Los contenidos totales de Se y Hg obtenidos en los pescados analizados varían desde 0.74 hasta $1.6\ mg\ kg^{-1}$ y desde 0.022 hasta $0.75\ mg\ kg^{-1}$, respectivamente (Tabla 1). En lo que respecta a los pescados que se sitúan en los niveles más altos de la cadena trófica, como son el atún y el pez espada, estos presentan elevadas concentraciones de Se (1.6 ± 0.1 and $1.4 \pm 0.2\ mg\ kg^{-1}$, respectivamente), y de Hg (0.75 ± 0.03 and $0.23 \pm 0.04\ mg\ kg^{-1}$, respectivamente), debido fundamentalmente a procesos de biomagnificación [6,7,8,9]. Análisis estadísticos llevados a cabo mediante test de ANOVA evidenciaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los contenidos totales de Se y Hg entre el atún y el pez espada. En lo que respecta a los salmones, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en sus contenidos en Se total, lo que puede ser debido a su distinto modo de vida y fuentes de alimentación.

La Figura 1 representa la correlación entre los contenidos de Se y Hg total y los valores de HBV_{Se} obtenidos. Todos los valores de HBV_{Se} obtenidos para todos los pescados estudiados fueron positivos (Tabla 1, Figura 1), lo que indica que el Se está en exceso (en relación molar) con respecto al Hg y, por tanto, constituyen opciones seguras para el consumo.

2.2. Determinación de especies de Se extraídas del músculo de pescado mediante HPLC-ICP-MS y confirmación por HPLC-ESI-MS/MS

Una correcta evaluación de la seguridad de los alimentos seleccionados implica determinar no solamente el contenido total sino la forma química en que se encuentran tanto en el mercurio como el selenio.

La extracción de las especies de Se se llevó a cabo en las fracciones proteicas solubles extraídas del músculo de pescado. Para ello, a 0.5 g de muestra se le adicionaron 5.0 mL de Tris-HCl 30 mM pH 7.5 y 20 mg de proteasa XIV (aislada de *Streptomyces griseus*) y se dejó incubando en un baño termostático a 37 °C durante 24 h. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de nylon de 0.22 µm.

Para la separación de las especies de Se se utilizó una columna cromatográfica de intercambio aniónico (Hamilton PRP-X100, 250x4.1 mm, 10 µm) acoplada al equipo ICP-MS. La elución de las especies se llevó a cabo en modo isocrático. La fase móvil empleada consistió en ácido cítrico 10 mM pH 5.0 MeOH 2 % (v/v), con un caudal de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección 100 µL.

Para la confirmación de la identidad de las especies detectadas por HPLC-ICP-MS, los extractos de las muestras se analizaron además por HPLC-ESI-MS/MS (Agilent G6410B Triple Quadrupole LC/MS System), utilizando una columna de fase inversa (Phenomenex Kinetex EVO C18 column, 150x3 mm, 5 µm). El volumen de inyección fue de 5 µL y la fase móvil consistió en A (95 %): agua MilliQ con 0.1 % ácido fórmico y B (5 %): acetonitrilo con 0.1 % ácido fórmico. Se empleó un modo de elución isocrático con un caudal de 0.5 mL min⁻¹. El análisis de masas se realizó en modo de ionización por electrospray positivo (ESI). Se seleccionó [M+H]⁺ como ion precursor y la detección se llevó a cabo en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), con un tiempo de permanencia de 50 ms, monitorizando dos transiciones selectivas para cada analito.

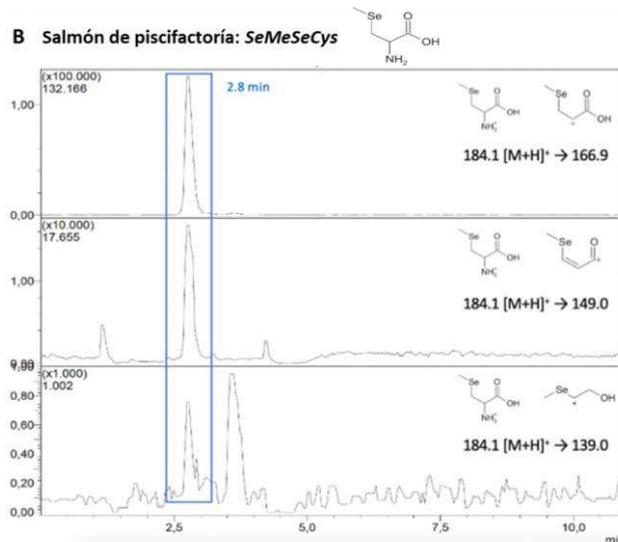
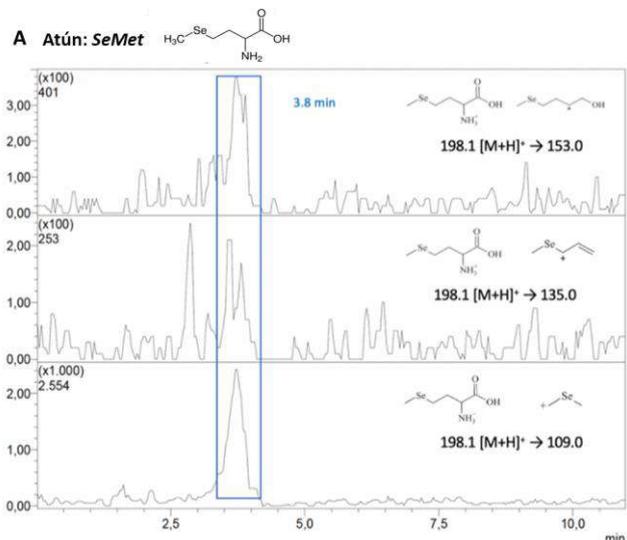


Figura 2. Análisis del extracto enzimático obtenido por HPLC-ESI-MS/MS para la confirmación e identificación de las especies (A) SeMet en atún (B) SeMeSeCys en salmón de piscifactoría.

En la Figura 2 se muestran dos ejemplos de la confirmación de las especies de Se detectadas en el atún y en el salmón de piscifactoría. La especie selenometilselenocisteína (SeMeSeCys) fue identificada en todos los pescados. Además, en el caso del atún, también se evidenció la presencia de la especie selenometionina (SeMet). Ambas especies de selenio poseen relevancia biológica. La SeMeSeCys es un seleno aminoácido al que se le han atribuido en repetidas ocasiones propiedades anticarcinogénicas. Por otra parte, la SeMet es un aminoácido de selenio que se incorpora de forma aleatoria en las proteínas en lugar de la metionina (Met).

2.3. Especiación de Hg en pescados mediante HPLC-ICP-MS

La extracción de las especies de Hg (mercurio inorgánico, Hg²⁺, metilmercurio, MeHg⁺ y etilmercurio, EtHg⁺) del músculo de los pescados se llevó a cabo empleando 1 % (w/v) L-cisteína·HCl·H₂O como extractante, seguido de calentamiento en una estufa a 60 °C durante 2 h. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 20 min.

Para la separación de las especies de Hg se utilizó una columna cromatográfica de fase inversa (Phenomenex Kinetex EVO C18 column, 150x3 mm, 5 µm) acoplada al equipo ICP-MS, siendo la fase móvil 0.1 % (m/v) L-cisteína y 0.1 % (m/v) L-cisteína·HCl·H₂O, con un caudal de 1 mL min⁻¹ y volumen de inyección de 100 µL. La separación se llevó a cabo en modo isocrático.

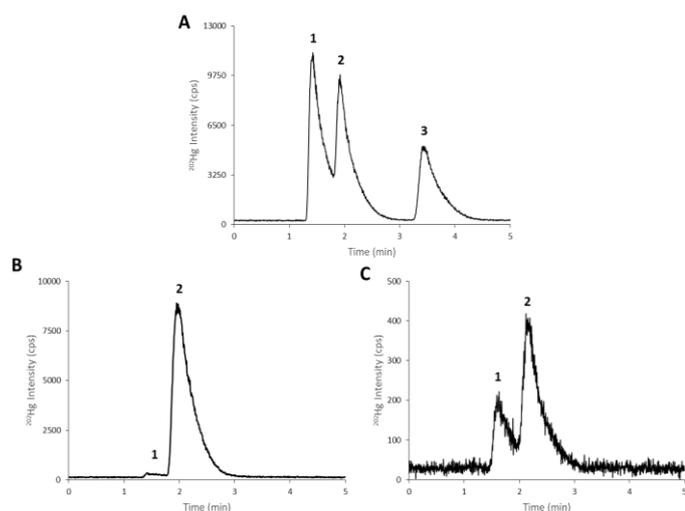


Figura 3. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-ICP-MS de (A) disolución patrón que contiene 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} , MeHg^+ y EtHg^+ (B) atún (C) salmón salvaje. Los números 1, 2 y 3 encima de los picos se refieren a Hg^{2+} ($\text{Tr} = 1.418$ min), MeHg^+ ($\text{Tr} = 1.906$ min) y EtHg^+ ($\text{Tr} = 3.442$ min).

Debido a la complejidad de la matriz de las muestras, se empleó el método de calibrado de adiciones estándar y mediante la prueba de Student ($\alpha = 0.05$) se evidenció la presencia de efecto matriz en todas las muestras.

Se calcularon los límites de cuantificación para cada analito mediante el análisis de 10 réplicas de un blanco y aplicando el criterio $10 \cdot \text{SD}$, obteniendo $\text{LOQ} (\text{Hg}^{2+}) = 0.02 \text{ mg kg}^{-1}$ y $\text{LOQ} (\text{MeHg}^+) = 0.002 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Se llevaron a cabo estudios de recuperación para evaluar la eficacia del método de extracción propuesto. Para ello, cada especie de Hg (Hg^{2+} o MeHg^+ , $30 \mu\text{g L}^{-1}$) fue adicionada a las muestras antes de comenzar el proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas están detalladas en la Tabla 2. En el caso de los salmones los valores de recuperación obtenidos no fueron cuantitativos, aunque si reproducibles para varias réplicas ensayadas. Estos valores se tuvieron en cuenta para el cálculo de la concentración total de cada una de las especies

Tabla 2. Recuperaciones de Hg^{2+} y MeHg^+ obtenidas al adicionar a las muestras $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada especie.

Pescado	Recuperación Hg^{2+} (%)	Recuperación MeHg^+ (%)
Atún	90 ± 6	93 ± 9
Pez espada	101 ± 4	103 ± 5
Salmón de piscifactoría	52 ± 4	64 ± 1
Salmón salvaje	56 ± 3	66 ± 1

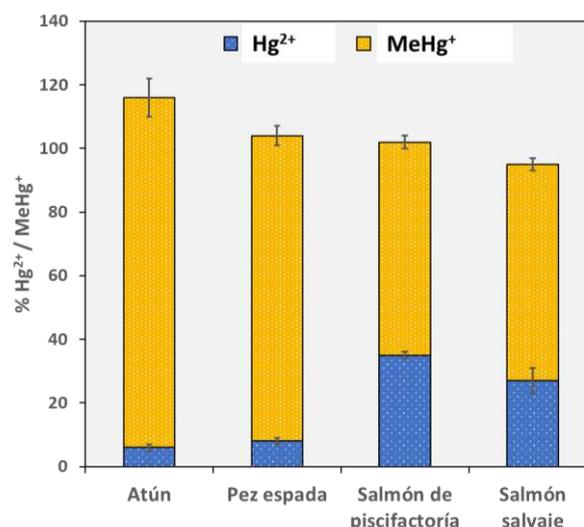


Figura 4. Distribución de las especies de Hg encontradas en el músculo de los pescados analizados.

Asimismo, se llevó a cabo un balance de masas para todos los pescados analizados y en todos los casos los valores fueron cuantitativos. La Figura 4 muestra la concentración de cada una de las especies de Hg expresada en porcentaje con respecto a la concentración de Hg total. La especie EtHg^+ no fue detectada en ninguna muestra. Se observa que las distribuciones de Hg^{2+} y MeHg^+ muestran una clara tendencia: el MeHg^+ es la especie de Hg mayoritaria. Sin embargo, no existe un factor de conversión único que permita correlacionar la cantidad de MeHg^+ presente en un pescado con respecto a su contenido total de Hg, ya que depende en gran medida del nivel trófico en que se sitúe el pez, su tamaño o su edad, entre otros factores [10]. En los peces depredadores la cantidad de MeHg^+ llega a representar hasta el 90 % del Hg total. Los resultados obtenidos están en concordancia con estudios realizados por la EFSA (2012) [3] donde se ha puesto de manifiesto que los peces situados en la parte inferior de la cadena trófica no solo presentan menores concentraciones de Hg total, sino también de MeHg^+ .

Como puede observarse en la Figura 4, los contenidos de MeHg^+ del atún y del pez espada (110 ± 6 y 96 ± 3 %, respectivamente) con respecto al salmón de piscifactoría y el salmón salvaje (67 ± 2 y 68 ± 2 %, respectivamente) son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), presentando los salmones concentraciones de Hg^{2+} más elevadas que en el caso de las especies depredadoras. Por otra parte, debido a su liposolubilidad, el MeHg^+ permanece más tiempo en un organismo que el Hg^{2+} [10]. Por lo tanto, los peces depredadores y con ciclos de vida más largos presentarán una mayor concentración de Hg en forma de MeHg^+ . Además, el MeHg^+ es objeto de especial preocupación, no solo porque los peces normalmente tienen un mayor contenido en esta especie y por su neurotoxicidad, sino también porque se ha demostrado que su absorción en el organismo humano es de hasta el 95%, mientras que la absorción del Hg^{2+} no supera el 38% [11].

3. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha determinado el contenido de Se y Hg total en el músculo de pescados de elevado consumo, así como las formas químicas en las que están presentes. Las especies depredadoras (atún y pez espada) son las que mayores contenidos en Se y Hg presentan, debido fundamentalmente a procesos de biomagnificación. El cálculo del índice HBV_{Se} proporcionó resultados positivos para todos los pescados, pudiéndose afirmar que el Se en estas muestras se encuentra en un exceso molar con respecto al Hg y que, por tanto, está en cantidad suficiente como para poder llevar a cabo las funciones biológicas necesarias en las que está implicado en el organismo. En este sentido, una ingesta moderada de estos pescados no conllevaría un riesgo potencial para el consumidor en relación a su exposición al mercurio

Los estudios de especiación de Se que se llevaron a cabo mediante HPLC-ICP-MS y confirmados por HPLC-ESI-MS/MS revelaron que SeMeSeCys está presente en todos los pescados (atún, pez espada, salmón de piscifactoría y salmón salvaje) y, además, en el caso del atún también se identificó SeMet. En cuanto a la especiación de Hg se refiere, mediante análisis por HPLC-ICP-MS se obtuvieron las distribuciones de las dos especies de Hg identificadas en todos los pescados, Hg^{2+} y $MeHg^+$. En estas se pueden observar claras diferencias entre las especies depredadoras (atún y pez espada) y los dos tipos de salmones (de piscifactoría y salvaje). En los primeros, la concentración de $MeHg^+$ llega a representar hasta el 90 % del contenido total de Hg, a diferencia de los salmones, donde la concentración de Hg^{2+} es muy superior.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la importancia de determinar no solamente el contenido total del elemento sino también de sus especies químicas, con el fin de establecer de forma correcta el riesgo-beneficio del consumo de pescados en relación con la exposición de mercurio. Es de especial relevancia destacar que en la actualidad los estudios de especiación requieren tanto de técnicas de espectrometría de masas atómica (ICP-MS) como de técnicas de espectrometría de masas molecular (HPLC-ESI-MS/MS), estas últimas con el objeto de establecer de forma inequívoca la identidad de las especies y sus posibles transformaciones.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-114714RB-100), a la Comunidad de Madrid y Fondos Europeos por el proyecto (FSE y FEDER) (S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II CM).

5. REFERENCIAS

[1] WHO (World Health Organization), Mercury in health care, (2005).
 [2] WHO (World Health Organization), Guidance for

identifying populations at risk from mercury exposure, (2008).

[3] E. Panel, F. Chain, Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, EFSA J. 10 (2012).

[4] J. Burger, K.F. Gaines, C.S. Boring, W.L. Stephens, J. Snodgrass, M. Gochfeld, Mercury and selenium in fish from the Savannah River: Species, trophic level, and locational differences, Environ. Res. 87 (2001) 108–118.

[5] L.J. Raymond, N.V.C. Ralston, Mercury: selenium interactions and health implications, Neurotoxicology. 81 (2020) 294–299.

[6] N.V.C. Ralston, J.J. Kaneko, L.J. Raymond, Selenium health benefit values provide a reliable index of seafood benefits vs. risks, J. Trace Elem. Med. Biol. 55 (2019) 50–57.

[7] A.M. Azad, S. Frantzen, M.S. Bank, B.M. Nilsen, A. Duinker, L. Madsen, A. Maage, Effects of geography and species variation on selenium and mercury molar ratios in Northeast Atlantic marine fish communities, Sci. Total Environ. 652 (2019) 1482–1496.

[8] N.V.C. Ralston, C.R. Ralston, L.J. Raymond, Selenium Health Benefit Values: Updated Criteria for Mercury Risk Assessments, Biol. Trace Elem. Res. 171 (2016) 262–269.

[9] M. Ribeiro, N. Zephyr, J.A.L. Silva, M. Danion, T. Guérin, I. Castanheira, A. Leufroy, P. Jitaru, Assessment of the mercury-selenium antagonism in rainbow trout fish, Chemosphere. 286 (2022).

[10] D.S. Forsyth, V. Casey, R.W. Dabeka, A. McKenzie, Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada, Food Addit. Contam. 21 (2004) 849–856.

[11] P. Holmes, K.A.F. James, L.S. Levy, Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?, Sci. Total Environ. 408 (2009) 171–182.