



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



Índice

1.	Resumen.....	3
2.	Abstract	4
3.	Introducción	5
3.1	Alimentación y salud	5
3.2	Suplementos alimenticios	6
3.3	Mercurio.....	9
3.4	Mercurio en suplementos alimenticios.....	10
3.5	Determinación de mercurio	11
4.	Justificación y objetivos.....	11
5.	Metodología.....	13
5.1	Instrumentación.....	13
5.2	Muestras.....	14
5.3	Procedimiento analítico	15
5.3.1	Recta de calibrado.....	15
5.3.2	Método de análisis	17
5.3.3	Análisis de muestras.....	20
5.3.4	Límites de detección y cuantificación	21
6.	Resultados y discusión	22
6.1	Espirulina (Espirulina).....	22
6.2	Kaptogras (Laminaria Noruega)	23
6.3	Huesos y articulaciones (Cartílago de tiburón)	24
6.4	Antiox. Colágeno (Colágeno hidrolizado de pescado).....	24
6.5	Memory pro	25
6.6	Omega 3 (Mezcla de aceites de salmón y otros pescados azules).....	25
6.7	Onagra.....	25
6.8	Aceite de pescado (70% EPA y 10% DHA)	26
7.	Conclusiones.....	26
8.	Conclusions	26
9.	Valoración personal.....	27
10.	Bibliografía	27
11.	Anexos.....	30

1. Resumen

Llevar una dieta variada y equilibrada, al igual que un estilo de vida saludable es de gran importancia para la vida de las personas. Ya que así, se pueden evitar problemas por deficiencias de ciertos nutrientes, que en ocasiones, pueden llegar a ser graves y producir ciertas enfermedades.

A causa de esto, se ha producido un aumento en el consumo de complementos alimenticios. Éstos se pueden utilizar para complementar y evitar las deficiencias de ciertos nutrientes o se pueden usar para producir algún efecto físico en el cuerpo. Sea cual sea el caso, todo conlleva un riesgo, ya que al no necesitar de receta médica para su consumo puede haber problemas de automedicación o autodiagnóstico.

Muchos de los complementos alimenticios presentes en el mercado están hechos a base de algas o derivados de pescado, como pueden ser aceites, lo que se considera una de las fuentes principales de exposición al mercurio. Teniendo en cuenta la toxicidad del mismo, es importante saber la cantidad que se ingiere al tomar algunos de estos complementos.

Por ello en este trabajo se ha llevado a cabo una determinación directa de la cantidad de mercurio presente en algunos complementos alimenticios presentes en el mercado. Para las medidas se hace uso del equipo de espectrometría de absorción atómica “Hydra IIc”.

La cantidad de mercurio presente en las muestras, en todos los casos, se encontraba por debajo del límite máximo legal, lo que es un aspecto positivo. En otras muestras el nivel se encontraba por debajo del límite de detección o cuantificación.

2. Abstract

Eating a varied and balanced diet, as well as a healthy lifestyle, is of great importance for people's lives. In this way, you can avoid problems due to deficiencies of certain nutrients, which can sometimes become serious and cause certain diseases.

As a result, there has been an increase in the consumption of food supplements. These can be used to supplement and prevent deficiencies in certain nutrients or they can be used to produce some physical effect on the body. Whatever the case, everything carries a risk. Self-medication or self-diagnosis can be an issue as these no prescription is needed for consumption of these supplements.

Many of the food supplements on the market are made from algae or derived from fish subproducts, such as oils, and these are considered one of the main sources of exposure to mercury. Considering the toxicity of mercury, it is important to know the amount that is ingested when taking some food supplements.

For this reason, a direct determination of the amount of mercury present in some food supplements on the market has been carried out in the current work. The atomic absorption spectrometry equipment "Hydra IIC" has been used for the measurements.

The amount of mercury present in the samples, in all cases, was below the legal limit, which is a positive aspect. In some samples, the level was below the detection or quantification limit.

3. Introducción

3.1 Alimentación y salud

La alimentación y la nutrición tienen una gran importancia en la vida y salud de las personas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), “la nutrición es la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo. Una buena nutrición es un elemento fundamental de buena salud” (OMS, 2021).

El ser humano a lo largo de la historia ha ido cambiando sus hábitos alimenticios para poder adaptarse adecuadamente a las diferentes condiciones que se le presentaban en el medio. En la antigüedad, los humanos primitivos tenían una alimentación basada en la supervivencia y dependían de lo que recolectasen o capturasen. Conforme fue avanzando la sociedad, en la Edad Media el interés del hombre por los alimentos también fue en aumento, teniendo como objetivo el de satisfacer el hambre y la malnutrición. En la actualidad, la importancia de la alimentación y nutrición ha ido más allá de la mera supervivencia o evitar el hambre y determinadas carencias, sino que ahora se buscan además, alimentos con efectos protectores frente a enfermedades o alimentos que puedan aportar, además del valor nutritivo, otros componentes que permitan mejorar el estado físico o mental del cuerpo.

En los años 80 en Japón surgió el concepto de alimento funcional, debido a un grupo de científicos que estudiaban la relación entre la nutrición, la satisfacción sensorial y la fortificación, como elementos para favorecer aspectos específicos para la salud. Actualmente la legislación europea sigue sin contemplar una definición específica para los mismos.

En Europa la primera vez que apareció este concepto fue en los años 90 debido a la aparición de nuevos estilos de vida asociados a los hábitos laborables, a un aumento del poder adquisitivo y a la innovación de la industria alimentaria. Esta idea apareció en un documento elaborado por un grupo de expertos coordinados por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI), según el cual este concepto “implica que los alimentos y sus componentes tienen la capacidad de influir beneficiosamente en las funciones del cuerpo y ayudar a mejorar el estado de bienestar y salud y reducir el riesgo de enfermedades” (Ashwell M, 2002, ILSI).

En el mercado actual se puede encontrar una enorme variedad de alimentos de todo tipo, pudiéndose adaptar a las necesidades y gustos de todos los consumidores. Debido a esta gran variedad, si se lleva una dieta variada y equilibrada, contando con una buena salud y con las excepciones de padecer ciertas enfermedades relacionadas con la alimentación, es posible mantener y suplir completamente todas las necesidades nutricionales del organismo.

Aun así pueden seguir dándose ciertas deficiencias nutricionales, ya que éstas pueden depender de diversas causas tales como una mala alimentación, inanición debido a la falta de disponibilidad de alimentos, trastornos alimenticios, problemas para digerir alimentos o para absorber nutrientes de los alimentos o ciertas afecciones que impiden que una persona coma, así como otras causas sociales o económicas como la pobreza, desastres naturales o problemas políticos (Medline, 2019).

Es importante suplir las cantidades diarias recomendadas de todos los nutrientes, ya que éstas se determinan a partir de la cantidad que el organismo necesita para mantenerse sano. En la población española actual es muy poco frecuente encontrar ciertas deficiencias clínicas como puede ser escorbuto o raquitismo, sin embargo, sí que es frecuente el que haya personas con unas ingestas inferiores a las de referencia para diversas vitaminas y minerales. Las deficiencias nutricionales pueden provocar algunos problemas de salud, como problemas en la digestión, problemas de piel, retraso o anomalías en el crecimiento de los huesos e incluso demencia.

En numerosas ocasiones, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han sido algunas de las organizaciones interesadas, junto con los gobiernos de determinados países, para realizar campañas con sus determinadas acciones y estrategias, para tratar muchas de las carencias que pueden producirse en la población. Algunas de las estrategias básicas que se han llegado a utilizar han sido la mejoría de las dietas mediante la diversificación dietética, acciones de salud pública, fortificación o enriquecimiento de los alimentos o el suministro de suplementos terapéuticos (Michael C. Latham, 2002).

3.2 Suplementos alimenticios

Según la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo los complementos alimenticios son “productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada y comercializados en forma dosificada”.

En el mercado actual se puede encontrar gran cantidad de diferentes suplementos alimenticios con variedad de funciones como pueden ser digestivas, diuréticas, adelgazantes, antiinflamatorias, vitaminas/minerales, reguladores del colesterol... Éstos en ningún caso pueden sustituir a una dieta equilibrada, lo que debe aparecer en su etiquetado, al igual que está terminantemente prohibido que se le atribuya alguna propiedad que pueda prevenir, tratar o curar cualquier tipo enfermedad humana. También se debe incluir la cantidad de nutrientes o de sustancias con el efecto nutricional o fisiológico contenido en el producto de forma numérica, así como la dosis de producto recomendada por el fabricante y la advertencia de no superar la dosis diaria expresamente recomendada.

La población se encuentra cada vez más concienciada de la importancia de llevar no solo una vida sana y saludable como comer de forma equilibrada, hacer ejercicio, dormir lo suficiente, sino que en la actualidad hay una mayor preocupación por la prevención y disminución del riesgo de padecer ciertas enfermedades. Por ello, el uso de suplementos alimenticios se ha extendido y no solo con el objetivo de mejorar la salud, sino también para conseguir algún cambio físico o fisiológico que ayude o influya de alguna manera en la salud (J. Álvarez, 2004).

En 2020 se produjo un crecimiento récord de un 9.5% en las ventas de suplementos alimenticios, gracias en gran parte a los efectos mundiales de la pandemia del coronavirus. Es el primer año de seguimiento de Nutrition Business Journal de los mercados globales en el que en ningún país o región se produjo un descenso en las ventas de los mismos (Claire Morton Reynolds, 2020).

La preocupación de la población por la salud, el bienestar y la inmunidad ha llevado a un crecimiento de las ventas de productos a base de plantas botánicas en un 10.6% y de vitaminas y minerales con 10.3% en el año 2020. Se puede observar que los picos de ventas más grandes se encuentran en las regiones donde ha habido una mayor cantidad de casos de coronavirus (Claire Morton Reynolds, 2020).

Esto, junto con la fácil disponibilidad y gran variedad de suplementos alimenticios en el mercado, puede llegar a ser contraproducente ya que aporta una serie de riesgos sanitarios añadidos como el abuso de algunas sustancias, al igual que la automedicación o el autodiagnóstico.

El consumo de algunos complementos alimenticios de forma excesiva y durante periodos de tiempo muy prolongados puede tener efectos perjudiciales en la salud de las personas, ya que al no necesitar de un profesional para su consumo y dosificación, la población es libre de tomar cualquier tipo de suplemento en cualquier tipo de circunstancia, sea lo conveniente o no para su caso. Los consumidores por lo general parten de una desinformación y una falta de conocimientos sobre el tema, pudiendo llegar a poner en riesgo su salud debido a que no saben a qué tipos de riesgos se están exponiendo o pueden llegar a exponerse.

Por ello es necesario establecer una serie de niveles máximos de consumo para algunos nutrientes de forma que si se siguen las recomendaciones especificadas por el fabricante, no deberían de presentar riesgo alguno para los consumidores. Al igual que se debe asegurar que dichos complementos no son un peligro para la salud si se consumen en grandes cantidades, también debe de estar comprobado que con los mismos se consigue el propósito de complementar la ingesta de nutrientes. Los componentes nutricionales de los suplementos deberán estar presentes en cantidades significativas de forma que tengan ese efecto fisiológico o nutricional que los propios fabricantes aseguren.

En su fabricación está permitido el uso de diversas sustancias diferentes de las vitaminas y minerales, y todas ellas deben tener todas las garantías de calidad establecidas y deben de ser aprobadas por el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF).

Existe una amplia gama de nutrientes y otros componentes que pueden formar parte de los complementos alimenticios, como puede ser las vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales, fibra, aminoácidos, diversas plantas y extractos de hierbas. En lo que respecta a las vitaminas y los minerales, es fundamental que las sustancias químicas que se usen en la producción de los complementos alimenticios no solo no presenten peligros, sino que también se encuentren biodisponibles para el organismo.

Según una encuesta de la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU, 2018) los suplementos nutricionales que más se consumen en España son calcio, omega 3, magnesio y potasio, vitamina D, multivitamínicos, vitamina C y hierro. Afirman que el 30% de los españoles consumen complementos nutricionales ya sea con prescripción médica o por voluntad propia para mantener o mejorar la salud.

Uno de los ingredientes más utilizados en la fabricación de complementos, son los derivados de pescado, como pueden ser aceites u otro tipo de productos marinos al igual que las algas.

El consumo de pescado y marisco es altamente beneficioso para la salud ya que ambos son una fuente de energía y de proteínas de alto valor biológico, al igual que contribuyen a la ingesta de nutrientes esenciales como puede ser el yodo, el selenio, el calcio y las vitaminas A y D. Además, también proporcionan ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como los omega 3, que es un componente que está asociado con la buena salud.

A su vez, aunque el consumo de pescado tiene efectos muy positivos en la salud, tanto el pescado, los mariscos y los moluscos son la principal fuente de mercurio en los alimentos. Éste elemento también está presente de forma natural en el medio ambiente debido a la erosión de las rocas, los residuos que generan las erisiones volcánicas y los productos de algunas actividades humanas, como puede ser entre otras la combustión de petróleo y carbón.

3.3 Mercurio

El mercurio en los alimentos se puede presentar en forma de mercurio inorgánico y de mercurio orgánico, en el último caso, principalmente como metilmercurio. La forma más común de exposición es mediante el consumo de pescados y mariscos que contengan niveles muy altos de metilmercurio ya que éste compuesto se adhiere al tejido de los alimentos gracias a sus propiedades liposolubles. El metilmercurio es la forma más tóxica del mercurio y de mayor preocupación desde el punto de vista sanitario, ya que es particularmente tóxico para el sistema nervioso, pudiendo afectar al desarrollo normal del cerebro en los lactantes y, en niveles más elevados, puede causar modificaciones neurológicas en los adultos.

Uno de los principales problemas del mercurio es su bioacumulación, es decir, su concentración progresiva en organismos vivos. Lo que ocurre es una bioacumulación a lo largo de la cadena trófica, de manera que toda la cantidad de sustancia contaminante que se encontraba en el organismo de la presa pasa al organismo del depredador. Y así sucesivamente hasta llegar a los niveles más altos de la cadena, por lo que cuanto más alto se encuentre ese organismo, más acumulación del mismo tendrá.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido ingestas semanales tolerables (TWI) o niveles seguros destinados a proteger a los consumidores de los efectos adversos para la salud que plantea la posible presencia de dichas especies de mercurio en los alimentos.

Según el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, la cantidad máxima de mercurio permitida en los diferentes tipos de pescado y marisco es de 0.5 mg/kg de producto fresco, con la excepción de algunas especies que por naturaleza tienen mayor facilidad para acumular el mercurio en sus tejidos, que se encuentran especificadas en el anexo del Reglamento (CE) nº 629/2008. Para dichas especies el contenido máximo permitido está en 1.0 mg/kg de producto fresco. Todo ello queda reflejado en las tablas del Anexo I.

La comisión Europea solicitó al panel científico de la EFSA sobre contaminantes de la cadena alimentaria (Panel CONTAM) una nueva revisión e información sobre la toxicidad de dichas formas de mercurio y su relación con el consumo de pescados y mariscos. El panel concluyó que con la ingesta de 1 a 2 porciones de mariscos por semana y de hasta 3 o 4 porciones por semana durante el embarazo, puede producir una mejora en el desarrollo neurológico de los niños en comparación con el no consumo de mariscos. Estas cantidades también se han asociado con un menor riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria en adultos.

3.4 Mercurio en suplementos alimenticios

Es necesario el establecimiento de un control y unos límites de contaminantes presentes, como pueden de metales pesados, en los complementos alimenticios.

El Reglamento (CE) nº 1887/2006 de la Comisión establece los contenidos máximos para determinados contaminantes presentes en los productos alimenticios incluido el contenido máximo de metales como el plomo, el cadmio y el mercurio. La presencia de estos metales debe de estar a unos niveles en los que no repercuta negativamente en la salud de las personas. Deben de ser niveles seguros y lo más bajos posible y siempre llevando a cabo unas buenas prácticas agrícolas, pesqueras y de fabricación.

La cantidad máxima de mercurio permitida en complementos alimenticios según el Reglamento (CE) nº 629/2008 es de 0,1 mg/ kg de producto.

Según la EFSA, el valor de referencia toxicológico para el metilmercurio como Ingesta Semanal Tolerable (TWI) es de 1,3 µg/kg de peso corporal. Este valor significa que una persona puede ingerir dicha cantidad a la semana durante toda su vida sin llegar a tener efectos adversos en su salud.

En la memoria del 2019 del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), queda reflejado que en 2019 hubo un aumento del 12% en las notificaciones relacionadas con “otros productos”, que en su mayoría corresponden a complementos alimenticios. En el 2019 hubo 69 notificaciones relacionadas con los complementos alimenticios, de las cuales 45 están relacionadas con las composiciones del producto. Ninguna de ellas es debido a la presencia de niveles no tolerables de mercurio.

3.5 Determinación de mercurio

Debido a la toxicidad del mercurio y su importancia con respecto a la salud de los humanos, existe un gran interés en el desarrollo de técnicas analíticas sensibles y fiables para su determinación. A la hora de determinar mercurio total hay una gran variedad de técnicas que proporcionan dicha información y como consecuencia también se buscan otro tipo de técnicas que sean capaces de separar e identificar las diversas especies de mercurio para poder evaluar sus diferentes formas de impacto (Ruiz, 2016).

Entre las técnicas que se emplean en la determinación de mercurio destacan: la espectroscopia de absorción atómica (AAS), la espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS) y la espectrometría de masas con fuentes de plasma.

La espectroscopia de absorción atómica es una de las técnicas más empleadas para la determinación de mercurio en prácticamente cualquier medio (Panichev y Panicheva, citado en Ruiz, 2016).

Esta técnica consiste, en primer lugar, en convertir la muestra en vapor atómico mediante un proceso de atomización, para luego ser sometida a la interacción de una fuente de excitación, de manera que se puede cuantificar la absorción que experimenta. Es un método muy útil por su sencillez relativa y gran sensibilidad para determinar mercurio en diferentes muestras.

4. Justificación y objetivos

Teniendo en cuenta toda la información recopilada anteriormente y debido al gran consumo y demanda por parte de la población de los complementos alimenticios, es importante que éstos sigan y cumplan las normativas vigentes.

Se han llegado a notificar a través del Sistema de Alerta Rápida para Alimentación y Piensos (RASFF) la presencia de contenidos elevados de plomo, cadmio y mercurio en algunos suplementos, por lo que se ha demostrado que los complementos alimenticios pueden ser una causa de exposición a estos elementos. Para proteger la salud pública de los consumidores, es necesario establecer una serie de contenidos máximos para estos elementos en los complementos alimenticios y es importante que los suplementos que se encuentren en el mercado cumplan dichos niveles.

Hay que tener en cuenta también la toxicidad del mercurio ya que puede causar y afectar gravemente a la salud si se está expuesto al mismo durante un periodo largo de tiempo o si se consume en grandes cantidades. Existen determinados grupos con un mayor riesgo como pueden ser las mujeres embarazadas o los niños.

Al no necesitar de un profesional o una prescripción médica para el consumo de los suplementos alimenticios, esto conlleva a un mayor riesgo para la salud de las personas. Se debe tener en cuenta la posibilidad de un consumo excesivo de los mismos y el propio autodiagnóstico que realiza el consumidor.

La preocupación actual por la salud y por la prevención del riesgo de padecer enfermedades, produce un aumento en el consumo de los complementos alimenticios a modo de protección y se tener un, mayor sentimiento de seguridad, sin tener en cuenta en ocasiones que no es necesario o sin tener en cuenta algunos de los riesgos que se pueden correr.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo es la determinación de la cantidad de mercurio en diversos suplementos alimenticios que se pueden encontrar en el supermercado al alcance de todo el mundo. El instrumento utilizado para las medidas es el de espectrometría de absorción atómica “Hydra IIc” que está diseñado específicamente para la determinación de mercurio. Para conseguir este objetivo principal, hay que llevar a cabo una serie de objetivos secundarios:

1. Selección de complementos que hay en el mercado en base a sus componentes
2. Determinar las mejores condiciones del equipo para realizar las medidas
3. Realización de un calibrado
4. Medida de los diferentes suplementos alimenticios
5. Determinación de la cantidad de mercurio en las muestras

5. Metodología

5.1 Instrumentación

Para la realización de este estudio se utilizó el equipo de espectrometría de absorción atómica “Hydra IIc”. Es un analizador que está totalmente automatizado y es capaz de medir mercurio en muestras sólidas y semisólidas sin ninguna digestión ácida y con bastante rapidez.

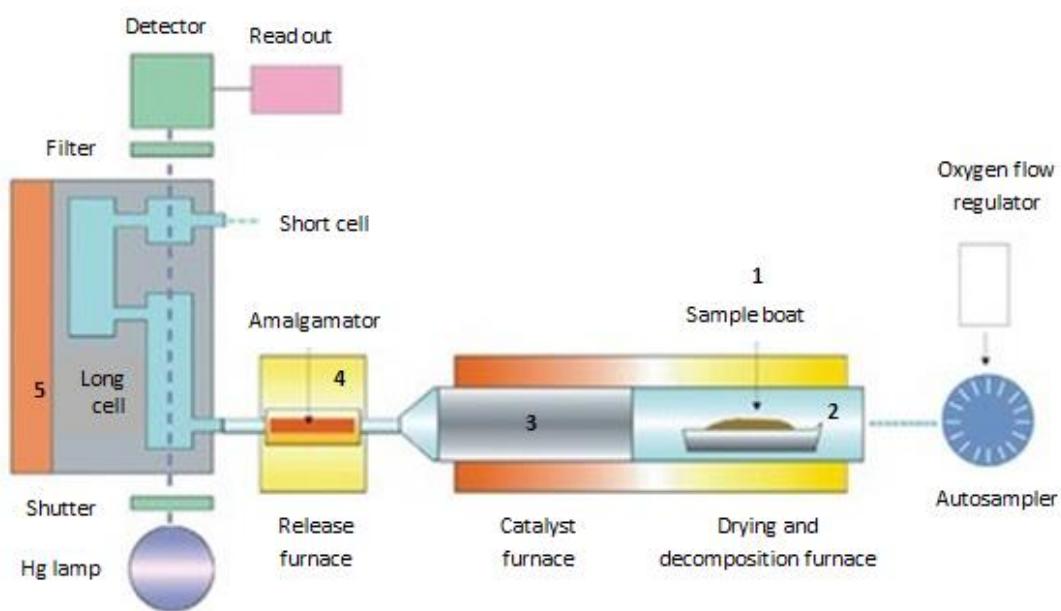


Figura 1. Proceso de descomposición de las muestras en el equipo de espectrometría de absorción atómica Hydra IIc (Johan Nortje, 2010).

La muestra se pesa en una naveccilla (1) y se coloca en el soporte para la misma. Después ésta se introduce en el horno (2) donde sufre un proceso de calentamiento en el que primero se seca y luego se descompone en presencia de O_2 haciendo que se vaporice el mercurio. Los productos de descomposición pasan a través de un catalizador (3) a alta temperatura donde quedan atrapados los halógenos, óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre para después eliminarlos.

Posteriormente se encuentra una membrana que retiene la humedad. Finalmente, el mercurio se transporta junto con los gases de reacción a un amalgama o trampa de oro (4) donde éste queda atrapado de forma selectiva. Posteriormente la trampa de oro se calienta y libera todo el mercurio retenido al espectrofotómetro (5) de absorción atómica, donde se mide la absorbancia a 253,7 nm. Éste equipo cuenta con la ventaja de que es capaz de realizar la detección de Hg en dos rangos diferentes gracias a que posee dos celdas ópticas. La primera es la que tiene una mayor sensibilidad y la segunda se usa cuando las concentraciones de Hg son muy elevadas. En todas las medidas el equipo elige la celda que considera adecuada para esa muestra, aunque se pueden observar siempre ambos valores.

5.2 Muestras

Las muestras seleccionadas se compraron en un supermercado. Se escogieron complementos que contuvieran derivados de pescado, como puede ser aceites o colágeno, al igual que algunos que contenían algas, ya que en este tipo de muestras es donde es más probable que se encuentre Hg. También se decidió escoger otros que no contuvieran elementos de origen marino para que sirvieran como muestra control. Los complementos analizados fueron los siguientes:

Complemento	Nombre comercial	Principio activo con Hg
1	Espirulina	Espirulina
2	Kaptogras	Laminaria Noruega (alga marina)
3	Huesos y articulaciones	Cartílago de tiburón
4	Antiox. Colágeno	Colágeno hidrolizado de pescado
5	Memory pro	-
6	Omega 3	Mezcla de aceites de salmón y otros pescados azules
7	Onagra	-
8	Sol	Aceite de pescado (70% EPA y 10% DHA)

Tabla 1. Complementos alimenticios seleccionados para realizar el estudio y su principio activo.

Se encontraron varias formas de presentación. Los complementos 1, 2, 3, 4, y 5 contenían cápsulas monodosis que se podían abrir fácilmente y en su interior estaban en forma de polvo, por lo que eso facilitó mucho el análisis de dichas muestras a la hora de pesarlas.

Los complementos 6, 7 y 8 iban en forma de cápsulas cuya cubierta estaba hecha de gelatina y en su interior contenía aceite, en forma líquida. Para ello se usó una jeringuilla para pinchar la pastilla y se vertió el aceite a la navelcilla correspondiente para pesarla.

5.3 Procedimiento analítico

5.3.1 Recta de calibrado

Para llevar a cabo este estudio, primero se realizó una curva patrón de cinco puntos con concentraciones de mercurio aproximadamente de 1, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{L}$. Para ello se usaron micropipetas de 10, 100 y 1000 μL .

Al ser concentraciones muy pequeñas, para una mayor facilidad es recomendable partir de una disolución madre (D_m) de mayor concentración y a partir de ella realizar el resto de disoluciones deseadas diluyendo la misma. La disolución madre se obtiene a partir de una disolución patrón de concentración 1000 mg/L de la cual se toman 50 μL y se diluyen en 50 mL de agua milliQ para obtener una disolución de concentración 1 mg/L.

Para saber las cantidades de disolución madre que hay que tomar para realizar el resto de disoluciones se utiliza la fórmula siguiente:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

El volumen final de todas las disoluciones patrón será de 10 mL. Los cálculos realizados son los siguientes:

$$[1 \mu\text{g}/\text{L}]: 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * V_i = 1 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0.01 \text{ mL}$$

$$[5 \mu\text{g}/\text{L}]: 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * V_i = 5 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0.05 \text{ mL}$$

$$[10 \mu\text{g}/\text{L}]: 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * V_i = 10 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0.1 \text{ mL}$$

$$[50 \mu\text{g}/\text{L}]: 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * V_i = 50 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0.5 \text{ mL}$$

$$[100 \mu\text{g}/\text{L}]: 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * V_i = 100 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 1 \text{ mL}$$

En la práctica, debido a variaciones que se pueden producir al trabajar con pipetas, el valor real no se corresponde exactamente al teórico calculado como se indica anteriormente. Por ello, para conseguir una mayor exactitud, las disoluciones anteriores se realizaron por pesada, considerando que el patrón de Hg tiene una densidad de 1 kg/L, igual que la disolución de agua milli-Q. Así se pueden recalcular las concentraciones obteniendo los valores más exactos.

Para obtener la disolución madre se pesaron 51,5 μL de disolución patrón y se diluyeron pesando un volumen total de 50,444 g de agua milli-Q, por lo tanto se obtuvo una disolución con una concentración real de 1,021 mg/L.

A partir de esta disolución se obtienen las demás:

Disoluciones	Concentración teórica ($\mu\text{g Hg/L}$)	Volumen de Dm tomado (μL)	Volumen de agua final (mL)	Concentración real ($\mu\text{g Hg/L}$)
D1	1 $\mu\text{g/L}$	12,8	10,9272	1,19
D2	5 $\mu\text{g/L}$	49,0	10,6141	4,72
D3	10 $\mu\text{g/L}$	101,9	10,3715	10,1
D4	50 $\mu\text{g/L}$	493,2	10,7407	46,9
D5	100 $\mu\text{g/L}$	971,4	10,7045	92,7

Tabla 2. Concentraciones reales de las disoluciones elaboradas para la recta de calibrado.

Para medir las absorbancias se pipetean 100 μL de disolución en la naveccilla que se coloca en el equipo. Cada medida se realiza tres veces para poder obtener unos resultados representativos. Tras realizar las medidas se obtienen las siguientes señales:

Disoluciones	Masa Hg (ng)	Abs. media
D0 (Blanco)	0,000	2035,0
D1	0,119	2208,0
D2	0,472	5458,0
D3	1,010	10050,0
D4	4,690	47945,0
D5	9,270	88318,0

Tabla 3. Cantidad real de Hg en cada disolución patrón y sus señales de absorbancia correspondientes.

La recta de calibrado correspondiente a los valores de la tabla 6 es la siguiente:

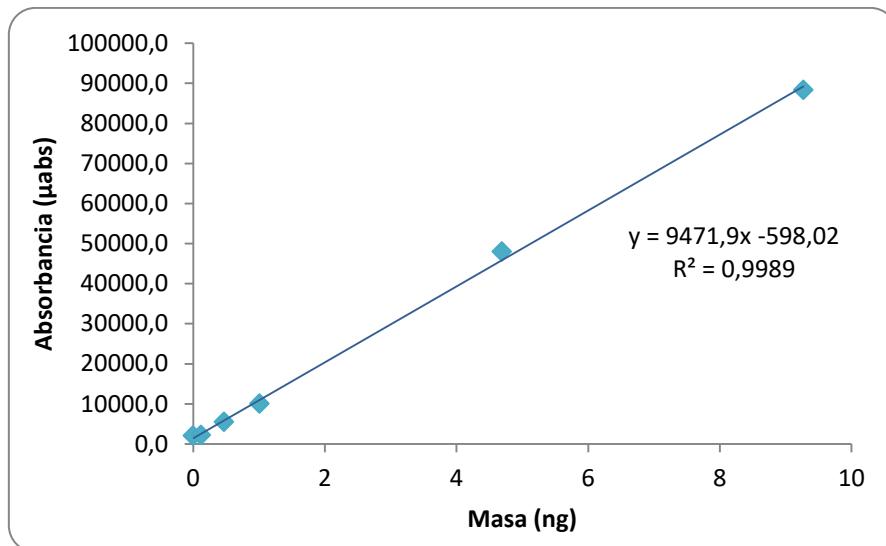


Figura 1. Recta de calibrado inicial

5.3.2 Método de análisis

A la hora de establecer las condiciones en las que se iba a medir, para ver cuales podían ser las óptimas se hicieron varias pruebas cambiando las condiciones con una de las muestras compradas (espirulina). Se hicieron tres medidas por cada condición establecida para poder ver y comparar los resultados entre ellas.

El objetivo era obtener unos resultados reproducibles y en el menor tiempo posible. Los parámetros que se podían variar en el equipo son el tiempo y la temperatura de las 3 fases implicadas; la de secado, la de combustión y la del catalizador. En este caso las condiciones del catalizador no se variaron en ninguna ocasión (600°C/60s) ya que son las recomendadas por el fabricante para retener bien los gases de sustancias interferentes.

Primero se probó con condiciones standard para ver qué tipo de señal daba, cómo salía la muestra, si existía o no ceniza para poder así optimizar los parámetros. Las primeras condiciones que se probaron fueron:

		Drying: 150°C/30s	Decomposition: 600°C/120s	Catalyst: 600°C/60s
Réplica	Absorbancia			
1	12635			
2	4471			
3	2973			
4	3008			

Tabla 4. Medidas de absorbancia de muestras de espirulina como prueba para determinar las condiciones de medida con las siguientes condiciones: Drying: 150°C/30s, Decomposition: 600°C/120s y Catalyst: 600°C/120s.

Los resultados de la tabla 4 fueron muy variables, tanto de absorbancia como de forma de la línea base. La línea base de la gráfica que da el equipo, salió en alguna de las muestras con una gran desviación. Podía ser debido a alguna pequeña presencia de agua. Tras estos resultados, se decidió aumentar el tiempo de secado para asegurarse de que la muestra estuviera totalmente seca. Las siguientes condiciones que se probaron fueron:

Drying: 150°C/120s Decomposition: 600°C/180s Catalyst: 600°C/60s	
Réplica	Absorbancia
5	3569
6	3324
7	4927

Tabla 5. Medidas de absorbancia de muestras de espirulina como prueba para determinar las condiciones de medida con las siguientes condiciones: Drying: 150°C/120s, Decomposition: 600°C/180s y Catalyst: 600°C/120s.

Al aumentar el tiempo de secado se puede ver en la tabla 5 que las señales de absorbancia son más similares entre sí, al igual que también mejoró la línea base de las muestras.

En cuanto a la ceniza que quedó en la naveccilla, tenía un color más blanquecino, más quemado que la ceniza que quedó con las condiciones de la tabla 4 que era más de color negro/oscuro. Con todo esto se concluye que con las condiciones de la tabla 5 se obtiene un mejor secado y combustión de la muestra que son las de la tabla 4.

Para continuar optimizando, como también se busca rapidez, se intentó disminuir el tiempo de descomposición para ver si se obtenían resultados parecidos a los de la tabla 5. Las siguientes condiciones fueron:

Drying: 150°C/120s Decomposition: 600°C/120s Catalyst: 600°C/60s	
Réplica	Absorbancia
8	3021
9	2714
10	3174

Tabla 6. Medidas de absorbancia de muestras de espirulina como prueba para determinar las condiciones de medida con las siguientes condiciones: Drying: 150°C/120s, Decomposition: 600°C/120s y Catalyst: 600°C/120s.

Las medidas correspondientes a la tabla 6 no dieron un perfil claro, había mucha variabilidad entre los resultados de las muestras. Se obtuvo una ceniza blanca pero las gráficas salieron muy desiguales al igual que con una desviación de la línea base. Por ello estas condiciones se descartaron.

Analizando los resultados anteriores, la mejor de las opciones fueron las condiciones de la tabla 5. Para comprobar que eran unas buenas condiciones, se hicieron 5 medidas más para ver si seguían siendo reproducibles. Las medidas fueron las siguientes:

Drying: 150ºC/120s Decomposition: 600ºC/180s Catalyst: 600ºC/60s	
Réplica	Absorbancia
11	2861
12	2869
13	2656
14	2836
15	3003

Tabla 7. *Medidas de absorbancia de muestras de espirulina como prueba para determinar las condiciones de medida con las siguientes condiciones: Drying: 150ºC/120s, Decomposition: 600ºC/180s y Catalyst: 600ºC/120s.*

Tras ésta última prueba se eligieron como los parámetros óptimos de medida unas temperaturas y tiempos de secado, combustión y del catalizador de 150ºC/120s, 600ºC/180s y 600ºC/60s respectivamente.

5.3.3 Análisis de muestras

Como la recta de calibrado y las medidas de las muestras no se realizaron en un mismo día, es normal que se puedan producir pequeñas variaciones ya sea por el equipo, el ambiente, la sensibilidad de la lámpara...

Para obtener unos resultados con mayor exactitud, cada día se realizaba el calibrado de un blanco y de uno de los puntos de la recta ($D_3 = 10 \mu\text{g/L}$). Con esos datos se calculaba un factor de corrección que se aplicaba a la recta de calibrado inicial para poder obtener de cada día una recta diferente que se ajustara a las condiciones de ese día concreto. Después se procedía a realizar las mediciones de las muestras. Los puntos del calibrado se miden en las navecerillas de cuarzo.

Las muestras se miden en las navecerillas de níquel. Para ello primero se tara la balanza con la navecerilla vacía y luego se procede a pesar la muestra.

El objetivo era saber la cantidad de Hg que se encontraba en cada cápsula, pero algunas de ellas tenían una cantidad muy alta, por lo que no se podía introducir tanta en el equipo para que no se sobrecargase. Por ello, dependiendo de la muestra se puso el peso de una cápsula o el de media, que eran rangos entre 0,2 y 0,4 g. De cada muestra se hicieron como mínimo cinco medidas, aumentando éste número si en algún caso salía alguna discordancia con el resto de los resultados o alguna desviación considerable en las gráficas, ya que es posible que en ocasiones existan interferencias. Tras la obtención de los resultados, se calcula la cantidad de mercurio presente en cada una de las muestras con la recta de calibrado hallada diariamente. Sabiendo la cantidad de Hg y el peso de la muestra, también se halla la concentración de Hg por gramo de muestra. A su vez, como se hicieron varias medidas de cada complemento, se calculó la media, la desviación estándar (s), que indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la media y el intervalo de confianza (IC) al 95%.

5.3.4 Límites de detección y cuantificación

Para luego poder interpretar los datos correctamente hay que hacer uso de los límites de detección y de cuantificación.

Límite de detección (LOD)

Es la cantidad o concentración mínima de una sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado y que es diferente al blanco. Se define con la fórmula siguiente, siendo s_0 la desviación standard de los blancos y S la sensibilidad:

$$LOD = \frac{3 * s_0}{S} = \frac{3 * 751,98}{9471,9} = 0,238 \text{ ng}$$

Límite de cuantificación (LOC)

Es la cantidad o concentración mínima que se puede cuantificar de forma fiable dentro de los límites específicos de precisión y exactitud y que es diferente al blanco. Se define con la fórmula siguiente:

$$LOC = \frac{10 * s_0}{S} = \frac{10 * 751,98}{9471,9} = 0,793 \text{ ng}$$

6. Resultados y discusión

A continuación se va a mostrar una tabla resumen con los resultados obtenidos:

Principio activo	Hg (ng)	Concentración (ng Hg/g)	s (ng Hg/g)	IC (95%)
Espirulina	0,2775 ₍₂₎	0,8387	0,0538	0,0564
Laminaria Noruega	2,799	6,957	0,3076	0,3825
Cartílago de tiburón	0,5578 ₍₂₎	1,227	0,1001	0,1050
Colágeno hidroliz. de pescado	0,1143 ₍₁₎	0,2910	0,0704	0,0875
- (Memory)	0,8640	2,0234	0,0503	0,0626
Aceites salmón	0,5577 ₍₂₎	1,6555	0,6308	0,5841
- (Onagra)	0,1108 ₍₁₎	0,2907	0,0462	0,0575
Aceite pescado (70 % EPA y 10% DHA)	0,0866 ₍₁₎	0,3302	0,0840	0,0881

Tabla 8. Resultados obtenidos tras la medición de las muestras

(1) Resultado por debajo del LOD

(2) Resultado por debajo del LOC

El límite máximo permitido en complementos alimenticios es de 0,1mg Hg/kg de producto según el Reglamento (CE) № 629/2008, lo que es igual a 100 ng Hg/g de producto.

6.1 Espirulina (Espirulina)

La espirulina (*Arthospira máxima* o *platensis*) es una microalga filamentosa flotante comestible de color azul verdoso, que pertenece a la clase de las cianobacterias con actividad fotosintética (Perez-Álvarez et al., 2018). Crecen en agua salada y en algunos grandes lagos de agua dulce.

La espirulina tiene un alto valor nutricional, ya que es una fuente importante de lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y antioxidantes. Por ello el estudio de sus beneficios y de su uso en la alimentación o en forma de complementos alimenticios se encuentra en auge.

Ciertos productos hechos a base de algas se cultivan bajo estrictas condiciones de control, en cambio, otras crecen en entornos naturales, donde hay una mayor probabilidad de contaminación por bacterias, tóxicos y metales pesados como puede ser el mercurio.

Al ser un alga, se encuentra en uno de los escalones más bajos de la cadena trófica, por lo que su bioacumulación de Hg no debería de ser muy elevada.

El resultado obtenido fue 0,8387 ng de Hg/g de producto, un valor que se encuentra por debajo del límite legal. Aun así, este resultado debe considerarse aproximado ya que se encuentra por debajo del límite de cuantificación del método.

En este caso se midió la cantidad presente en una cápsula. Si el fabricante establece como dosis máxima diaria 6 cápsulas, en este caso para hallar la cantidad de Hg que se ingeriría al día se realizaría el siguiente cálculo:

$$\text{Cantidad Hg total ingerida} = 0,2775 \text{ ng Hg} * 6 \text{ cápsulas} = 1,665 \text{ ng Hg al día}$$

6.2 Kaptogras (Laminaria Noruega)

La Laminaria Noruega o *Ascophyllum nodosum* es un alga marina que se halla en el océano Atlántico norte y océano Pacífico norte. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre sus efectos y beneficios ya que tiene una gran variedad. Es muy utilizada como fertilizantes o en complementos alimenticios.

Entre sus características principales destacan que es un alga muy rica en minerales, con bajo contenido en hierro y está formada por una serie de polisacáridos (ácido algínico, laminaria y fucoidina) que intervienen en la eliminación de la glucosa y del colesterol ya que impide su absorción intestinal (Bahar et al. 2016). Por ello esta alga se usa en muchos complementos alimenticios con efecto adelgazante o de “capta grasas” como puede ser en este caso.

La Laminaria noruega, al ser otra alga, su bioacumulación no debería de ser muy elevada.

El resultado fue de 6,957 ng Hg/g producto, un valor que también se encuentra muy por debajo del límite legal. No se quedó ningún tipo de residuo, se consiguió quemar toda la muestra.

En este caso se midió la cantidad de aproximadamente media cápsula ya que sino el equipo se podría sobrecargar. Si el fabricante establece como dosis máxima diaria una cápsula, para hallar la cantidad de Hg que se ingeriría con este complemento se realizaría el siguiente cálculo:

$$\text{Cantidad Hg total ingerida} = 2,799 \text{ ng Hg} * 2 = 5,598 \text{ ng Hg al día}$$

Se multiplica por dos ya que aproximadamente se pesó la mitad del contenido de la cápsula, por lo que la cantidad total de Hg en la muestra debería de ser el doble. Este es un dato aproximado ya que no se pudo realizar la valoración real de una cápsula entera.

6.3 Huesos y articulaciones (Cartílago de tiburón)

El mercurio, como se ha explicado anteriormente por el proceso de bioacumulación, está presente en mayores cantidades en los depredadores acuáticos de mayor tamaño, como puede ser el atún o el tiburón.

Principalmente el Hg se acumula en el tejido adiposo de los organismos de niveles tróficos superiores aunque también se puede acumular en el tejido muscular. Con menor prevalencia se acumula en el tejido conectivo (cartílago), por lo que cabría esperar una baja cantidad del mismo, aun así es de interés su determinación en este tipo de complementos.

Se obtuvo un valor de 1,227 ng Hg/g de producto, al igual que los complementos anteriores, muy por debajo del límite legal. Se quedó residuo en forma de ceniza blanquecina. Este resultado debe considerarse aproximado ya que se encuentra por debajo del límite de cuantificación del método.

Se midió la cantidad correspondiente a una cápsula. Si el fabricante establece como dosis máxima diaria cuatro cápsulas, para hallar la cantidad de Hg que se ingeriría al día se realizaría el siguiente cálculo:

$$\text{Cantidad Hg total ingerida} = 0,5578 \text{ ng Hg} * 4 \text{ cápsulas} = 2,2312 \text{ ng Hg al día}$$

6.4 Antiox. Colágeno (Colágeno hidrolizado de pescado)

El colágeno es una proteína presente en todos los animales, terrestres y marinos incluidos los humanos. El colágeno de pescado proviene de espinas y piel de pescado, pero el problema es que es una molécula compleja que el cuerpo no puede asimilar y hay que hidrolizarlo. La hidrolización del colágeno consiste en una fragmentación o pre-digestión del mismo para hacerlo asimilable al cuerpo humano.

Aunque el colágeno forma parte del tejido conjuntivo y éste es el que menor prevalencia de acumulación de mercurio tiene, sigue siendo de interés la determinación del mismo en este complemento.

En este caso en la mayoría de réplicas se midió la cantidad correspondiente a una cápsula. Debido a una gran variabilidad y poca señal, se decidió probar con dos cápsulas para ver si era problema de que no había suficiente muestra. El resultado obtenido fue 0,2910 ng Hg/g de producto, lo que se encuentra por debajo del límite de detección.

Por lo tanto, en este complemento no se puede asegurar de manera fiable la presencia de Hg.

6.5 Memory pro

Éste es uno de los complementos control que no contenía ningún elemento de procedencia marina, por lo que se debería de esperar una señal baja. Sin embargo, proporcionó mayor señal de lo esperado.

El resultado obtenido fue 2,0234 ng Hg/g de producto, también muy por debajo del límite legal. Ésta señal podría ser debido a algún tipo de contaminación en el lugar de fabricación como puede ser en las cápsulas, ya que al no contener ningún elemento de origen marino, no se sabe muy bien de donde procede dicha señal.

De todas formas, se va a calcular la cantidad de Hg ingerida si se sigue la dosis recomendada por el fabricante que es 1 cápsula. Si se pesó aproximadamente la mitad de la cápsula:

$$\text{Cantidad Hg total ingerida} = 0,8640 \text{ ng Hg} * 2 = 1,728 \text{ ng Hg al día}$$

6.6 Omega 3 (Mezcla de aceites de salmón y otros pescados azules)

Los peces que más mercurio pueden contener son los pescados azules y los que se encuentran en las zonas más altas de la cadena trófica, como puede el pez espada, atún rojo o tiburón.

El salmón también es un pescado azul, sin embargo en su mayoría se crían en piscifactorías, por lo que esto permite controlar la calidad del agua en el que habitan. Los salmones salvajes se pescan cuando remontan por los ríos por lo que suelen presentar bajos niveles de mercurio a no ser que exista una contaminación en el río concreto en el que este por vertidos.

El resultado obtenido fue de 1,655 ng Hg/g de producto, muy por debajo del límite legal. Este resultado debe considerarse aproximado ya que se encuentra por debajo del límite de cuantificación del método.

Si la dosis diaria recomendada por el fabricante es de dos cápsulas y se pesó aproximadamente el contenido de 1 cápsula:

$$\text{Cantidad Hg total ingerida} = 0,5577 \text{ ng Hg} * 2 = 1,1154 \text{ ng Hg al día}$$

6.7 Onagra

Éste es el otro complemento control, que no contiene elementos de origen marino.

El resultado obtenido fue de 0,2907 ng Hg/g, un valor que se encuentra por debajo del límite de detección, por lo que no se puede asegurar de forma fiable la presencia de Hg en el mismo. Las señales que se obtuvieron fueron muy bajas y tenían grandes desviaciones de la línea base.

6.8 Aceite de pescado (70% EPA y 10% DHA)

En este caso este complemento tiene como principio activo aceite de pescado aunque no especifica qué tipo como puede ser en el caso del Omega 3.

El resultado obtenido fue de 0,3302 ng Hg/g de producto, un valor que se encuentra por debajo del límite de detección. No se puede asegurar la presencia de Hg en dicho complemento.

7. Conclusiones

1. El total de complementos analizados fue 8, de los cuales; 3 se encontraron por debajo del límite de detección, otros 3 por debajo del límite de cuantificación y 2 sí que dieron valores fiables.
2. De las 2 muestras que tuvieron valores por encima del límite de cuantificación, ambas se encuentran por debajo de los límites máximos autorizados en cuanto a la presencia de Hg en complementos alimenticios.
3. Hubo una gran variabilidad entre muestras, al igual que en algunas ocasiones no se pudo medir el contenido de la cápsula entera por lo que podría haber problemas de homogeneidad a la hora de las medidas.
4. Las mediciones con el equipo Hydra IIC fueron sencillas y directas, ya que se pudieron automatizar casi en su totalidad.

8. Conclusiones

1. The total of complements analyzed was 8, of which; 3 presented amounts of Hg below the detection limit, other 3 were below the quantification limit and 2 were found above the limits.
2. Of the two samples which had values above the limit of quantification, both are below the maximum permitted limits for the presence of Hg in food supplements.
3. There was a great variability between samples, as in some occasions the content of the entire capsule could not be measured, so there could be homogeneity problems at the time of the measurements.

4. Measurements with the Hydra IIc equipment were simple and straightforward, as they could be automated almost entirely.

9. Valoración personal

Este trabajo me ha permitido aumentar mis conocimientos sobre el mercurio, sus formas y los peligros que conlleva una gran ingesta del mismo, ya que aunque en la carrera se estudien muchos peligros, no se puede llegar a profundizar tanto en cada uno. También he aprendido formas y problemas que pueden surgir a la hora de su determinación, ya que en un principio el estudio que iba a realizar era el de desarrollo de un método analítico para la especiación de mercurio orgánico e inorgánico. Pero debido a unos problemas con el cambio de parámetros del equipo no pudo ser posible, por lo que se me planteó éste otro estudio, también muy interesante.

A su vez, me ha permitido seguir desarrollando algunos de los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera y aprender otros nuevos. Sobretodo conocimientos acerca del instrumental utilizado, como puede ser el equipo de espectrometría de absorción atómica.

Otro de los retos planteados, fue la búsqueda y recopilación de información, para luego seleccionar la que era fiable y necesaria, ya que en ocasiones se puede sacar mucha información de fuentes no demasiado fiables o se puede poner una información poco relevante.

Como resumen general y personal, opino que es un trabajo que me ha permitido experimentar como es el trabajo en un laboratorio fuera de un entorno donde se sigue un guion y ya está todo establecido. Sino que en este caso se trabaja más al día a día dependiendo de los resultados y conclusiones que se vayan sacando.

10. Bibliografía

Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) “Suplementos alimenticios-lo que usted necesita saber” Disponible en <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/supplementos-alimenticios-lo-que-usted-necesita-saber> (Consultado 27/05/21).

Agencia Catalana de Seguridad alimentaria (2020). *Mercurio/Metilmercurio*. Cataluña: GENCAT. Disponible en <https://acs.gencat.cat/es/detall/article/Mercurio---Metilmercurio> (Consultado 02/06/21).

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2007). *Líneas directrices del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) para la evaluación de los complementos alimenticios elaborados a base de componentes de origen vegetal y sus preparaciones*. Madrid: AESAN.

Álvarez, J. (2004) "Uso y abuso de los suplementos dietéticos". *Sección de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares*, 51 (2), pp 42-47.

Ashwell, M. (2002) "Concepts of functional foods", *International Life Sciences Institute*. Disponible en: <https://ilsi.eu/publication/concepts-of-functional-foods/>. (Consultado 29/05/21).

Bahar, B., O'Doherty, J., Smyth, T., Sweeney, T. (2016) "A comparison of the effects of an *Ascophyllum nodosum* ethanol extract and its molecular weight fractions on the inflammatory immune gene expression in-vitro and ex-vivo", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37(B), pp 276-285.

European Food Safety Authority (2012) "Mercury in food-EFSA updates advice on risks for public health". Disponible en <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/121220> (Consultado 29/05/21)

European Food Safety Authority (2014) "Scientific Opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury" 12(7):3761. Disponible en <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3761> (Consultado 28/05/21).

Jiménez Moreno, M. (2008). *Desarrollo de métodos analíticos para especiación de mercurio y su aplicación a la comarca de Almadén*. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha.

Latham, M.C. (2002) "Prevención de carencias específicas de microutrientes". En: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Prevención Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Roma: Colección FAO Alimentación y Nutrición nº 29.

Medline (2021) "Algas verdiazul", *Enciclopedia médica*. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/923.html> (Consultado 05/06/21)

Medline (2021) "Desnutrición", *Enciclopedia médica*. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000404.htm> (Consultado 29/05/21).

Morton, C. (2020) "The Analyst's Take: Global supplement sales pass \$150B in 2020", *Nutrition Business Journal*. Disponible en: <https://www.newhope.com/market-data-and-analysis/analysts-take-global-supplement-sales-pass-150b-2020> (Consultado 29/05/21).

Nortje, J. (2010) "Determination of Total Mercury in Fish and Biological Tissue Using a Direct Mercury Analyzer". *American Laboratory*. Disponible en <https://americanlaboratory.com/914-Application-Notes/502-Determination-of-Total-Mercury-in-Fish-and-Biological-Tissue-Using-a-Direct-Mercury-Analyzer/> (Consultado 01/06/21).

Organización de Consumidores y Usuarios (OCU) "Suplementos alimenticios, ¿para qué?" Disponible en: <https://www.ocu.org/alimentacion/comer-bien/informe/encuesta-suplementos-alimenticios> (Consultado 29/05/21).

Organización Mundial de la Salud. "La nutrición" Disponible en <https://www.who.int/topics/nutrition/es/> (Consultado 28/05/21).

Ortega, R., Jiménez, A., Perea, J.M., Navia, B. (2014) "Desequilibrios nutricionales en la dieta media española; barreras en la mejora", *Departamento de Nutricion. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.* 30 (supl. 2), pp 29-35.

Perez, I., Islas, H., Gómez, L.M. (2018). "Protective effects of Spirulina (*Arthrospira maxima*) against toxicity induced by cadmium in *Xenopus laevis*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109099>

Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado*, 244, de 9 de octubre de 2009.

Reglamento (CE) Nº 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, *Diario Oficial de la Union Europea*, 364.

Reglamento (CE) Nº 629/2008 de la Comisión de 2 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) no1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado*, 173.

Valero, M.A. y Leon, M. (2005) "Empleo de suplementos nutricionales orales basado en la evidencia". *Unidad de Nutrición Clínica. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid*, 52 (S2), pp 34-40.

11. Anexos

Anexo I

3.3	Mercurio	Contenido máximo (mg/kg peso fresco)
3.3.1	Productos de la pesca y carne de pescado (22) (47), excepto en el caso de las especies enumeradas en el punto 3.3.2	0,50
3.3.2	Carne de los siguientes pescados (24)(25): rape (<i>Lophius species</i>), perro del norte (<i>Anarhichas lupus</i>), bonito (<i>Sarda sarda</i>), anguila (<i>Anguilla species</i>), reloj (<i>Hoplostethus species</i>), cabezudo (<i>Coryphaenoides rupestris</i>), fletán (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>), rosada del Cabo (<i>Genypterus capensis</i>), marlin (<i>Makaira species</i>), gallo (<i>Lepidorhombus species</i>), salmonete (<i>Mullus species</i>), rosada chilena (<i>Genypterus blacodes</i>), lucio (<i>Esox lucius</i>), tasarte (<i>Orcynopsis unicolor</i>), capellán (<i>Trisopterus minutus</i>), pailona (<i>Centroscymnus coelolepis</i>), raya (<i>Raja species</i>), gallineta nórdica (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>), pez vela (<i>Istiophorus platypterus</i>), pez cinto (<i>Lepidopus caudatus</i>), sable negro (<i>Aphanopus carbo</i>), besugo o aligote (<i>Pagellus species</i>), tiburón (todas las especies), escolar (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>), esturión (<i>Acipenser species</i>), pez espada (<i>Xiphias gladius</i>), atún (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	1,0

Tabla 9. Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la comisión