



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# **TRABAJO DE FIN DE GRADO CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**INFLUENCIA DEL COCINADO EN LA DETERMINACIÓN DE HG EN  
PESCADO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.**

**INFLUENCE OF THE COOKING PROCESS ON THE DETERMINATION OF HG IN FISH  
BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

**AUTOR: VÍCTOR GÓMEZ MUÑOZ**

**DIRECTOR: MARTÍN RESANO EZCARAY**

**2020/2021**

# INDICE

1. [RESUMEN](#) (p. 4)
2. [ABSTRACT](#) (p. 5)
3. [INTRODUCCIÓN](#) (p. 6)
  - 3.1.[MERCURIO Y METILMERCURIO](#) (p. 6)
  - 3.2.[RIESGOS PARA LA SALUD](#) (p. 7)
  - 3.3.[FUENTES DE LA EMISIÓN DEL MERCURIO](#) (p. 9)
  - 3.4. [IMPACTO DE LA ACTIVIDAD HUMANA EN LA EMISIÓN DE MERCURIO AL MEDIO](#) (p. 10)
  - 3.5.[IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE PESCADO](#) (p. 14)
4. [OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN](#) (p. 15)
5. [METODOLOGÍA](#) (p. 16)
  - 5.1.[INSTRUMENTACIÓN](#) (p. 16)
  - 5.2.[MUESTRAS](#) (p. 17)
  - 5.3.[PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS](#) (p. 18)
  - 5.4.[PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS](#) (p. 20)
    - 5.4.1. [CONDICIONES DE ANÁLISIS](#) (p. 20)
    - 5.4.2. [RECTA DE CALIBRADO](#) (p. 21)
      - 5.4.2.1.[LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN](#) (p. 23)
    - 5.4.3. [ANÁLISIS DE MUESTRAS](#) (p. 24)
6. [RESULTADOS Y ANÁLISIS DE DATOS](#) (p. 25)
  - 6.1.[COCINADO CON ACEITES](#) (p. 25)
    - 6.1.1. [ACEITES EN DORADA](#) (p. 25)
    - 6.1.2. [ACEITES EN PALOMETA](#) (p. 26)
  - 6.2.[COCINADO CON ÁCIDO CÍTRICO](#) (p. 28)

- 6.2.1. [ÁCIDO CÍTRICO EN DORADA](#) (p. 28)
- 6.2.2. [ÁCIDO CÍTRICO EN PALOMETA](#) (p. 29)
- 6.3. [COCINADO CON SALMUERA](#) (p. 30)
  - 6.3.1. [SALMUERA EN DORADA](#) (p. 30)
  - 6.3.2. [SALMUERA EN PALOMETA](#) (p. 31)
- 7. [CONCLUSIONES](#) (p. 32)
- 8. [BIBLIOGRAFÍA](#) (p. 34)

## 1. RESUMEN

El gran impacto que ha tenido a lo largo de la historia la emisión de mercurio al medio debido a la actividad antropogénica al igual que los efectos adversos que presentan para la salud la exposición continuada a este tipo de componentes está bien documentado. Estos efectos se han evidenciado en casos tan conocidos como el de Minamata por la actividad industrial o el de Pakistán.

A pesar de que la principal fuente de ingesta de mercurio provenga de los productos de la pesca, este tipo de alimentos proveen de nutrientes esenciales para el desarrollo y en algunos países supone la principal fuente de alimentación. Es por ello que se han analizado el contenido de mercurio de muchas especies de pescado y se han establecido límites de ingesta para evitar riesgos en la salud. La gran mayoría de estos estudios son realizados en pescado crudo, sin haber sido sometidos a ningún proceso de transformación posterior que pudieran eliminar parte del mercurio.

Por esta misma razón, en este trabajo se ha buscado evaluar hasta qué punto, un proceso de transformación, es capaz de reducir el contenido de mercurio total en las muestras analizadas y por lo tanto conocer cuál sería la ingesta real de mercurio.

Para este cometido, se ha utilizado un equipo de espectrometría de absorción atómica “Hydra IIc” para medir el contenido de mercurio tras la aplicación de procesos de cocinado habituales como son el cocinado con aceites vegetales, en una salmuera y en una disolución de ácido cítrico.

Los resultados obtenidos parecen apuntar a que los cocinados con ácido cítrico y con una salmuera reducen el contenido de mercurio en la dorada mientras que en la palometa se mantienen estables.

## 2. ABSTRACT

The great impact that the emission of mercury into the environment due to anthropogenic activity has had throughout history, as well as the adverse health effects of continuous exposure to this type of components, has been well documented. These effects have been evidenced in well-known cases such as Minamata due to industrial activity or in Pakistan.

Although the main source of mercury intake comes from fishery products, this type of food provides essential nutrients for development and in some countries is the main source of food. For this reason, the mercury content of many fish species has been analyzed and intake limits have been established to avoid health risks. The vast majority of these studies are carried out on raw fish, without having been subjected to any subsequent transformation process that could eliminate part of the mercury.

For this same reason, in this work we have sought to evaluate to what extent a transformation process is capable of reducing the total mercury content in the samples analyzed and, therefore, to know what the real mercury intake would be.

For this purpose, a "Hydra IIc" atomic absorption spectrometer was used to measure the mercury content after the application of common cooking processes such as cooking with vegetable oils, in brine and in a citric acid solution.

The results obtained seem to indicate that cooking with citric acid and brine reduces the mercury content in "dorada" while it remains stable in "palometa".

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. MERCURIO Y METIL-MERCURIO

El metilmercurio se forma por la metilación del mercurio inorgánico del medio ambiente y es acumulado en el pescado. Posee una elevada toxicidad, se disuelve fácilmente en la grasa y es capaz de atravesar la barrera placentaria siendo capaz de producir daños en el normal desarrollo del feto. (AESAN, 2011)

Los comités científicos internacionales como la FAO o la OMS usan factores de seguridad que sirven para establecer las ingestas tolerables de algunas sustancias que pueden inducir toxicidad. Existen diferentes tipos:

- Ingesta diaria aceptable (acceptable *daily intake* – ADI). Es usada generalmente para describir los niveles de seguridad de la ingesta.
- Dosis de referencia (*reference dose* - RfD) e ingestas tolerables diarias o semanales (Tolerable intakes – TDI) son otros términos para describir la dosis de referencia.
- El comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) usa el término Ingesta Diaria provisional tolerable (*provisional tolerable daily intake* – PTWI): Es utilizado para contaminantes que se bioacumulan en el organismo.

(Herrman JL, Younes M. 1999)

Estos valores están basados en la concentración máxima en la que una sustancia no causa efectos adversos observados (NOEL/NOAEL), basados en los estudios toxicológicos en animales de experimentación y extrapolados de animales a humanos por la multiplicación de un factor de incertidumbre (generalmente  $f= 100$ ) (Speijers GJ. 1999)

En 2003, la FAO/OMS realizó una revisión de la PTWI reduciéndolo de 3,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del peso corporal (FAO/OMS, 2003)

En Europa, la exposición de la dieta del percentil 95 parece que se encuentra cerca o por encima de la ingesta semanal tolerable (*tolerable weekly intake – TWI*) para el mercurio y para todos los grupos de edad. Aquellos grupos de elevado consumo de pescado podrían llegar hasta 6 veces la TWI. (Panichev, N. A., & Panicheva. 2015).

### **3.2.RIESGOS PARA LA SALUD**

El mercurio metálico es una sal que se conocía desde la antigüedad, pero aquellos compuestos orgánicos que tienen un enlace covalente del mercurio con el radical de una molécula orgánica se identificaron por primera vez en el siglo 19. Los primeros estudios identificaron la aparición de síntomas como la perdida sensitiva de pies, manos y cara, perdida de la visión, sordera, ataxia (pérdida de la coordinación), entre otros (Edwards GN. 1865).

A pesar de los estudios tempranos sobre las consecuencias de la exposición al mercurio y al metilmercurio, durante un elevado periodo de tiempo, este elemento se estuvo utilizando como pesticida provocando grandes problemas para la salud en la población siendo los primeros casos localizados en Pakistán, Guatemala e Irak (Grandjean P, et al., 2010) A pesar de esto, la principal fuente de exposición al metilmercurio es casi exclusivamente debido al consumo de pescado o productos a base de pescado (Fitzgerald W.F., Clarkson T.W. 1991)

Actualmente, los efectos que el mercurio tiene en la salud están bien estudiados y clasificados. Ambos compuestos, mercurio inorgánico y metilmercurio, provocan daños en el sistema nervioso central y periférico y los daños generados se pueden observar tanto si han sido inhalados, ingeridos o aplicados en la piel. Los principales síntomas son

temblores incontrolados, insomnio, pérdida de memoria, efectos neuromusculares, dolores de cabeza y disfunciones motoras.

Los niños son los individuos que son más vulnerables a la exposición del mercurio a partir de la ingesta de pescado. El metilmercurio consumido por una mujer embarazada puede provocar problemas en el neurodesarrollo del feto provocando retrasos cognitivos en el mismo, perdida de pelo, problemas de aprendizaje y pérdidas de memoria. (WHO, 2007)

Es por eso mismo que existen recomendaciones en el consumo de determinados tipos de pescado por su elevado contenido en mercurio. La agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición recomienda que para determinadas poblaciones sensibles se reduzca el consumo de algunos tipos de pescado como son el Pez Espada, el tiburón, el atún Rojo y lucio. También recomienda evitar el consumo en mujeres embarazadas y niños de menos de 3 años de edad y limitar el consumo a 50 gramos la semana en niños de entre 3 a 12 años de edad (AESAN, 2011)

Uno de los mayores eventos de intoxicación por este tipo de compuestos ocurrió en Minamata, una zona en la prefectura de Kumamoto, Japón. El 1 de mayo de 1956 un doctor notificó a las autoridades competentes problemas neurológicos en dos jóvenes de esta comunidad. Poco tiempo después multitud de casos fueron notificados en la misma zona. Tras lo sucedido se realizó un estudio analítico para evidenciar el origen de la enfermedad y se esclareció que había una relación entre las familias pesqueras y la aparición de la enfermedad. Tiempo más tarde, debido a la presencia de mercurio en los cuerpos tras la autopsia y debido a la similitud de los síntomas con un síndrome ya conocido, se asoció la enfermedad con el metilmercurio. No fue hasta 9 años después que el gobierno no emitió un comunicado público sobre lo sucedido en relación con la emisión de mercurio por parte de la fábrica. Se desconoce el número total de muertos y afectados por esta

patología ya que fue muy extendida en el tiempo y pueden presentarse los síntomas mucho tiempo después de la exposición al mercurio (Tsuda, T. et. al. 2009)

### **3.3.FUENTES DE LA EMISIÓN DE MERCURIO**

El mercurio es un elemento natural que se encuentra distribuido por todo el mundo. Existen muchas fuentes naturales donde se puede encontrar. Por ejemplo, se haya en muchos sulfuros que se utilizan para su obtención, aunque, actualmente, se obtiene principalmente de su recuperación de la industria. También es una impureza en algunos metales no ferrosos y en el carbón. (UNEP Global Mercury Assessment, 2013)

La actividad humana ha facilitado el movimiento del mercurio por el medio ambiente incrementando sus concentraciones en la atmósfera, en suelos y en el agua. Estas emisiones han incrementado desde la revolución industrial debido a la quema de grandes contenidos de carbón y de otros mineralespreciados (UNEP Global Mercury Assessment, 2013)

Aunque el movimiento del mercurio y sus emisiones al medio ambiente y al aire son importantes para comprender cual es la emisión real en algunas zonas, es en las zonas acuáticas donde el mercurio es transformado en metilmercurio, la sustancia que es más tóxica y que es capaz de acumularse en los animales. Además, la mayoría de la exposición a este compuesto y los problemas para la salud vienen dados por el consumo de alimentos de origen marino. (EFSA, 2003)

Los ciclos del mercurio en el medio acuático son similares en todos los sistemas y consiste en lo siguiente:

La forma predominante del mercurio en el medio acuático es su forma inorgánica, que se encuentra disuelta mientras que la gaseosa supone menos del 30%. Normalmente el metilmercurio se encuentra a niveles de trazas, pero puede llegar a suponer, en algunos casos, hasta el 30% del mercurio total (UNEP Global Mercury Assessment, 2013)

El mercurio puede ser eliminado del medio acuático de dos formas. Cuando el mercurio inorgánico se transforma en mercurio elemental, este puede ser reemitiido a la atmósfera: si el mercurio se une a algunas partículas del agua, este se puede depositar como un sedimento. Los modelos sugieren que alrededor del 70% del mercurio que se deposita en el océano se vuelve a emitir a la atmósfera. El mercurio oxidado es reducido por procesos biológicos y fotoquímicos a mercurio elemental, el cual puede ser emitido a la atmósfera. Al eliminar este elemento, se reduce la cantidad de mercurio que puede ser transformado en metilmercurio por los organismos marinos (UNEP Global Mercury Assessment, 2013).

### **3.4.IMPACTO DE LA ACTIVIDAD HUMANA EN LA EMISIÓN DE MERCURIO AL MEDIO**

La mayoría de las emisiones vienen dadas por la actividad antropogénica, como pueden ser la extracción primaria, el tratamiento de mercurio, el uso de mercurio en productos y procesos industriales, la extracción de oro y la gestión de residuos de mercurio (Reglamento (UE) 2017/852)

En el estudio UNEP Global Mercury Assessment (2013), se consideraron dos categorías de emisión de mercurio por los humanos: Emisión por la acción directa del ser humano de mercurio en el agua y zonas de emisión de mercurio debido a la actividad industrial previa (zonas contaminadas).

Tabla 1: Emisiones de mercurio de algunos sectores de producción, en toneladas por años y como porcentaje de la emisión global

<b>Sector</b>	<b>Emisiones (rango), toneladas</b>
Producción de metales no ferrosos	92.5 (19.3 - 268)
Productos de desecho del consumidor	89.4 (22.2 - 308)
Producción de Cloro alcalino	2.8 (1.0 – 5.5)
Refinamiento de aceites	0.6 (0.3 – 1)
<b>Total</b>	<b>185 (42.6 – 582)</b>

(UNEP Global Mercury Assessment, 2013)

Estos datos fueron obtenidos a partir de la estimación de la emisión de mercurio al aire por lo que puede que se estén omitiendo fuentes de emisión al agua importantes que no emiten apenas a la atmósfera.

Tabla 2: Emisiones al agua de zonas contaminadas, en toneladas por año dentro del rango de lo estimado

<b>Sector</b>	<b>Emisiones (rango), toneladas</b>
Lugares de extracción de mercurio	6.7 – 26.6
Centros de producción de metales preciosos	1.4 – 5.5
Producción de metales no ferrosos	0.1 – 0.5
Producción de Cloro alcalino	0.1 – 0.5
Otros centros de producción industrial	0.1 – 0.3
<b>Total</b>	<b>8.3 – 33.5</b>

(UNEP Global Mercury Assessment, 2013)

Estos valores son obtenidos a partir de la estimación de cuanto mercurio se encuentra disponible en esas superficies y cuanto se emite en un año.

Estos datos son importantes para determinar la importancia no solo de la emisión directa de mercurio al medio acuático sino si antiguas zonas de explotación minera e industrial pueden suponer una fuente importante y prolongada de contaminación. Esto es debido a que, durante la acción minera, algunos suelos y sedimentos quedan expuestos a erosión directa permitiendo la difusión de forma más favorable al medio. De igual forma, la deforestación expone los suelos a la erosión permitiendo el desplazamiento de este mineral a las aguas de los ríos y al mar.

Otras formas en las que se puede emitir mercurio al ambiente son a partir del uso de pesticidas con base de mercurio, aunque actualmente se ha reducido mucho su producción. Es de hecho que en la unión europea está prohibida la utilización de productos fitosanitarios basados en el mercurio según lo dispuesto en el Reglamento (CE) Nº 1107/2009 por el cual los residuos fitosanitarios *“No deberán tener efectos nocivos en la salud humana, incluida la de los grupos vulnerables, ni en la salud animal, teniendo en cuenta los efectos acumulativos y sinérgicos conocidos cuando se disponga de métodos científicos aceptados por la Autoridad para evaluar tales efectos, ni en las aguas subterráneas; no deberán tener efectos inaceptables en el medio ambiente.”*

Son por estas directrices que el mercurio, cumpliendo con las características descritas anteriormente que queda prohibido su uso, aunque su producción y utilización ya quedaba prohibida por la Directiva 79/117/CEE en 1978 y ahora queda prohibida la exportación de mercurio metálico y ciertos compuestos y mezclas de mercurio por el Reglamento (CE) Nº 1102/2008 superado posteriormente por el Reglamento (UE) 2017/852. Estas

medidas fueron necesarias debido a que alrededor del 40% al 80% de la deposición del mercurio proviene de fuera de la Unión.

A pesar de la eliminación de estos compuestos, existen algunos productos con residuos de mercurio por encima del *límite de determinación*<sup>1</sup> (LD) establecidos en el Reglamento (CE) N° 396/2005. Se llegó a la conclusión que gran parte de esta contaminación por mercurio se debía a la contaminación medioambiental por el uso previo de estos compuestos por lo que se tuvieron que establecer valores *límite máximo de residuos*<sup>2</sup> (LMR) adaptados a esta situación y que valoraran objetivamente el uso o no de productos fitosanitarios de esta índole. Estos criterios se encuentran también en el Reglamento (CE) n.º 396/2005

Aunque estos valores no se aplican para la pesca ni los productos acuáticos sirve para exemplificar la importancia de la emisión residual de mercurio al medio y como prevalece en el tiempo en suelos y aguas.

---

**1 - Límite de determinación:** menor concentración de residuo validada que se puede cuantificar y notificar en un seguimiento sistemático con métodos validados de control. (Reglamento (CE) n° 396/2005)

**2 - Límite máximo de residuos (LMR),** el límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos establecido de conformidad con el presente Reglamento, basado en las buenas prácticas agrícolas y la menor exposición del consumidor necesaria para proteger a todos los consumidores vulnerables. (Reglamento (CE) n° 396/2005)

### **3.5. IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE PESCADO**

La contaminación por metilmercurio supone un importante desafío para la salud pública debido a que principalmente este compuesto se encuentra acumulado en el pescado, además, es un alimento con un elevado contenido de nutrientes y que, para algunas comunidades, es la principal fuente de alimentación.

Los beneficios del consumo de pescado están bien reconocidos y estudiados. El pescado supone una importante fuente de energía y proteína de alto valor biológico y que además contribuye a la ingesta de nutrientes esenciales como el yodo, selenio, calcio, vitaminas A y D. Por adición, son una fuente esencial de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Omega 3, DHA, EPA) que son unos de los componentes asociados a dietas saludables. La mayoría de guías dietéticas en Europa recomiendan el consumo de al menos dos porciones de pescado a la semana para aquellos grupos poblacionales de bajo riesgo (EFSA 2004)

El consumo de 1-2 a 3-4 porciones de pescado por semana durante el embarazo está asociado a una mejora del desarrollo neuronal en los niños en comparación a aquellos que no lo tomaron. Además, esta misma ingesta ha sido asociada a una reducción del riesgo de sufrir una enfermedad coronaria. Dentro de estas asociaciones en el consumo de pescado se valoró también la ingesta simultánea de aquellos compuestos que pueden presentar riesgos para la salud como el metilmercurio. (EFSA 2004)

#### **4. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.**

Con todo lo dicho, la contaminación de los alimentos sigue siendo una preocupación que concierne a la gran mayoría de la población, en especial aquella contaminación dada por metales tóxicos como el mercurio. Es por ello que a pesar de los múltiples estudios que analizan y determinan la presencia de este compuesto en productos marinos, gran parte de ellos son hechos a partir de productos crudos no evaluando por ende la ingesta real tras su cocinado

Por esta misma razón se decidió primero aplicar técnicas de cocinado según unas diferentes condiciones que fueran de uso común en la vivienda y que a priori pudieran suponer una reducción significativa en el contenido de mercurio y así poder establecer que diferentes tipos de tratamientos podrían ser útiles para reducir el riesgo de exposición al mercurio tanto para la población general como para aquellas personas susceptibles.

Se optó por usar dos especies de pescado que son consumidas de forma habitual las cuales fueron la dorada y la palometa.

Aunque no se prevé que su contenido de mercurio sea excesivamente elevado como lo sería el pez espada, el atún o el tiburón, en este estudio se prioriza determinar, aunque el contenido sea bajo, si se reduce significativamente el contenido de mercurio.

Por todo esto, los objetivos principales del estudio son los siguientes:

1. Determinar cuál es el contenido de mercurio de dos especies diferentes de pescado de consumo habitual en el hogar como son la dorada y la palometa.
2. En segundo lugar y como objetivo principal del estudio, evaluar la reducción del contenido de mercurio en estas dos mismas especies de pescado aplicando

diferentes tipos de cocinado (aceite de oliva, aceite de semillas, salmuera y ácido cítrico) y considerar si alguno de estos tipos de cocinado puede ser recomendado para prevenir la ingesta de mercurio.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. INSTRUMENTACION

Para la determinación de mercurio: Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica de masas de modelo “Hydra IIc”, un “analizador” de mercurio por descomposición térmica cuyo funcionamiento es el siguiente:

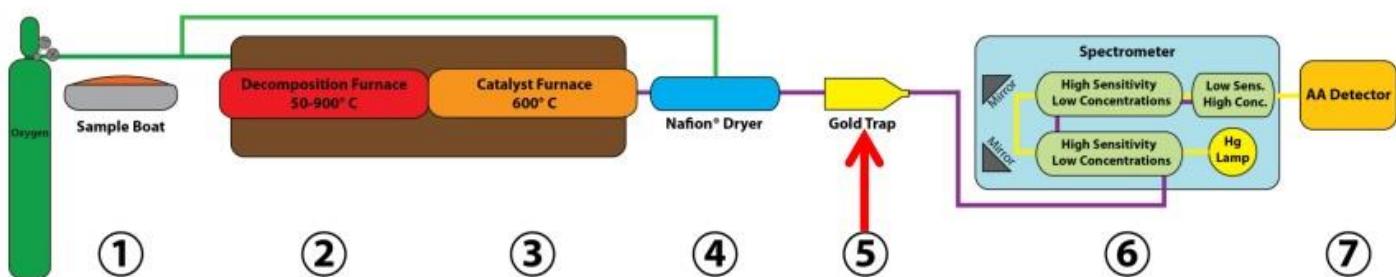


Figura 1: Diagrama de proceso del equipo Hydra IIc de los laboratorios Teledyne Leeman (Teledyne Leeman Labs, 2017)

La muestra pesada se dispone en un barquillo de níquel (1) y es introducida en el horno de descomposición en presencia de un flujo de oxígeno (2). La temperatura del horno sube para producir en primer lugar un secado de la muestra durante un tiempo determinado y después una combustión de la muestra. Los gases liberados producto de la descomposición pasan a través de un horno catalizador para eliminar halógenos, óxidos de nitrógeno y óxidos de nitrógeno (3). El resto de los productos de la combustión, incluyendo el mercurio elemental pasan a través de un secador Nafion® (4) (polímero hidrofóbico) y después por una trampa de oro (5) que atrapa el mercurio y deja que el

resto de gases sigan. Por último, la trampa de oro se calienta liberando el mercurio elemental junto con un gas que lo transporta hasta el espectrómetro (6).

En el espectrómetro este gas pasa a través de dos celdas ópticas de 5 pulgadas (25,4 cm) de alta sensibilidad (para concentraciones bajas) y una célula óptica de 1 pulgada (2,54 cm) de baja sensibilidad (para concentraciones elevadas). La luz de las lámparas de mercurio se transmite a través de las celdas usando un sistema de espejos. La señal transitoria es medida en un detector de absorción atómica (7). Los dos picos son procesados y se da el valor según la mejor calibración de las dos células disponibles. El uso de estas dos células provee el mejor límite de detección con un rango dinámico más amplio el dado por una única célula óptica.

Cada uno de los filetes cocinados fue envasado individualmente en una bolsa de plástico y se realizó vacío en una envasadora al vacío (Modelo TECNOTRIP / EV-13-L-CD-SC) y posteriormente congelado a una temperatura  $< -18^{\circ}\text{C}$  como forma de evitar la pérdida de mercurio por volatilización y que las medidas posteriores se asemejen a los valores reales tras el cocinado. Se aplicó un programa de vacío poco intenso y de una sola fase debido a la naturaleza sólida de las muestras.

## 5.2. MUESTRAS

Para la realización de este estudio se decidió tomar dos especies de pescado de consumo habitual en el hogar como son la dorada y la palometa, el primero proviene de un sistema de acuicultura mientras que el segundo proviene de pesca natural. El pescado antes de su cocinado es previamente limpiado y cortado transversalmente en forma de filetes entre 1,5 y 2 cm de grosor. Ambos fueron comprados frescos en la cadena de distribución Mercadona y cuyos lotes y zonas de procedencia son los siguientes:

- Dorada (*SPARUS AURATA DORADE*): GLN: 5206146000002. Producto de Acuicultura. Productor: SELONDA. Lugar de sacrificio: GR15FISH0008. FAO Code: SBG. Zona de captura: FAO 37.3. Numero de Lote: 01175010. Grecia

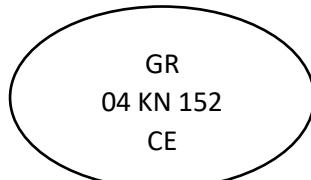


Imagen 1: Marca Oval Registro Sanitario del operador económico de la dorada

(Reglamento (CE) nº 853/2004)

- Palometa (*BRAMA BRAMA*): Productor: PESCADOS ROBERTO S.L. Número de Lote: 9059810782106004003. Zona de captura: FAO 34 Atlántico centro-oriental

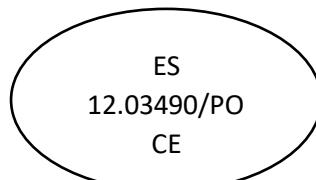


Imagen 2: Marca Oval Registro Sanitario del operador económico de la palometa

(Reglamento (CE) nº 853/2004)

### 5.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se van a emplear dos tipos de especies habituales para la evaluación del mercurio aplicando diferentes tipos de cocinado: dorada y palometa.

Los tipos de cocinados utilizados son aquellos que son favorables para la reducción del mercurio (Panichev, N. A., & Panicheva. 2015). Se van a utilizar 3 tipos de cocinados:

Hervido con aceite de girasol y oliva; Sumergido en una disolución de ácido cítrico y hervido en una salmuera tal y como aparecen representados en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3: Cocinado a una temperatura de  $160^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  con aceite de semillas y aceite de oliva a distintos tiempos de cocción.

Aceites de cocinado		
$T^a = 160^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	Aceite de Girasol	Aceite de Oliva
Tiempo = 2 min	AS2'	AO2'
Tiempo = 4 min	AS4'	AO4'

Tabla 4: Cocinado a temperatura de ebullición ( $\pm 100^{\circ}\text{C}$ ) a distintas concentraciones de ácido cítrico y mismo tiempo de cocción.

Disolución ácido cítrico			
Temperatura de ebullición ( $\pm 100^{\circ}\text{C}$ )	$C = 0,05\text{M}$	$C = 0,1\text{M}$	$C = 0,2\text{M}$
Tiempo = 3 min	C1	C2	C3

Tabla 5: Cocinado a temperatura de ebullición ( $\pm 100^{\circ}\text{C}$ ) con distintas concentraciones de una salmuera y mismo tiempo de cocción.

Salmuera			
Temperatura de ebullición ( $\pm 100^{\circ}\text{C}$ )	$C = 0,2\text{M}$	$C = 0,45\text{M}$	$C = 0,6\text{M}$
Tiempo = 3 min	S1	S2	S3

- Para el cocinado con aceites se adiciona en una sartén una cantidad tal que cubra el volumen total del filete (se adicionaron 300 ml de aceite en este caso) y se añade el filete de pescado previamente limpiado y cortado una vez alcanzadas las condiciones de temperatura establecidas en la *Tabla 3*.
- Para el cocinado con una disolución de ácido cítrico, se dispone en una olla la disolución previamente preparada según condiciones establecidas en la *Tabla 4* y se adiciona el filete una vez alcanzado la temperatura de ebullición.
- Para el cocinado en la salmuera, se preparan en recipientes separados las diferentes concentraciones de sal en agua establecidas en la *Tabla 5* y de igual forma, una vez alcanzada la temperatura de ebullición, se añade el filete.

## 5.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

### 5.4.1. CONDICIONES DE ANÁLISIS

Antes de empezar con la medición de los patrones y las muestras hay que fijar cuales van a ser las condiciones de trabajo del instrumento. Para ello, en primer lugar, se toma una muestra de pescado y se coloca en una navelilla de níquel. El tamaño tomado tiene que ser parecido al tamaño con el que se trabajará para medir las muestras. La navelilla se introduce y se establecen las condiciones que fueron las siguientes:

Tabla 6: Condiciones de temperatura y tiempo iniciales del equipo “Hydra IIc”

Condiciones de análisis	
Temperatura de secado / tiempo	150° C / 1'
Temperatura de descomposición / tiempo	600° C / 3'

Una vez que la naveccilla abandonaba el equipo, es preciso valorar dos parámetros para decidir se si modificaban las condiciones iniciales. La primera, visualizar si la ceniza resultante de la muestra tiene un color blanquecino propia de una combustión idónea. La segunda, comprobar que la señal proporcionada por el equipo, la cual determina el valor total de mercurio de las muestras, no tiene interferencias, los picos de señal se encuentran bien diferenciados y la línea base es estable.

En este caso, las condiciones estándar del equipo resultaron ser idóneas para la realización del análisis del resto de las muestras por lo que no se probaron otras condiciones.

#### 5.4.2. RECTA DE CALIBRADO

Para realizar la recta de calibrado se realizó en primer una disolución del estándar de mercurio intermedia (D1) con una concentración de 1ppm para después realizar las concentraciones de mercurio necesarias. En este caso se realizó una curva patrón de 6 puntos con unas concentraciones estimadas de: 1ppb – 5ppb – 10ppb – 25ppb - 50ppb – 100ppb.

Los valores de los puntos de la recta de calibrado reales fueron los siguientes:

Tabla 6: Volumen tomado de la disolución D1 respecto del volumen final y la concentración final de mercurio de puntos de la curva patrón

ml D1 (1ppm Hg)	Volumen final (ml)	Concentración (ppb Hg)
0,0094	10,2961	0,9130
0,0484	10,5849	4,5726
0,0994	9,9324	10,0077
0,2526	9,8868	25,5492
0,5046	10,8537	46,4911
1,0086	10,5613	95,4996

Una vez obtenidas las disoluciones de los puntos de la curva de calibrado se procede a su medición en el equipo “Hydra IIc”. Se añade 0,1 ml de cada disolución en las navelcillas y se realiza la medición. Los valores de absorbancia obtenidos son los siguientes:

Tabla 7: Contenido real de Hg en los puntos de calibrado y medida de absorbancia.

Concentraciones estimadas	Contenido de Hg real (ng)	$\mu$ Abs
BLANCO	0	691
	0	442
	0	343
P1 (1 ppb)	0,0913	1711
	0,0913	1672
	0,0913	1696
P2 (5 ppb)	0,4573	7188
	0,4573	7256
	0,4573	7146
P3 (10 ppb)	1,0008	15540
	1,0008	15586
	1,0008	15674
P4 (25 ppb)	2,5549	38676
	2,5549	41285
	2,5549	40667
P5 (50 ppb)	4,6491	70012
	4,6491	70283
	4,6491	71367
P6 (100 ppb)	9,5500	133289
	9,5500	135327
	9,5500	136645

Posteriormente se hace la recta de calibrado siguiente:

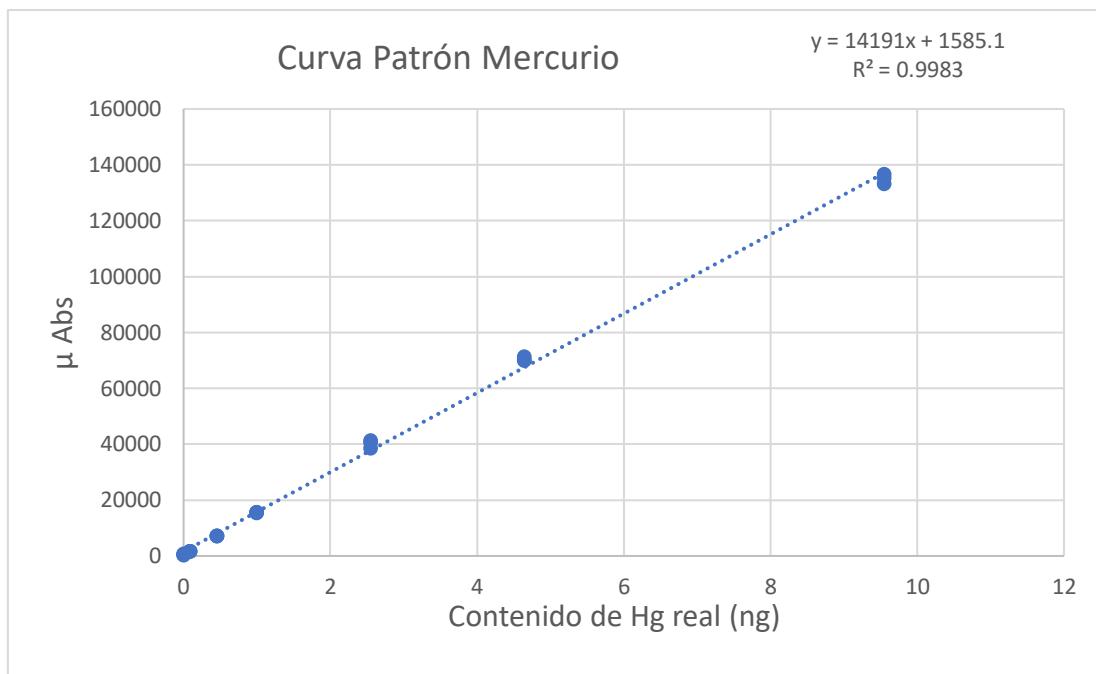


Figura 2: Recta de calibrado expresado en  $\mu$ Abs respecto de ng de mercurio.

#### 5.4.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

Como parte del conjunto y en orden de conocer todos los parámetros necesarios para poder llevar a cabo el experimento, se calcularon los límites de detección y de cuantificación.

- **Límite de detección:** El límite de detección se rige por la siguiente fórmula:

$$\text{Límite de detección} = (3 * \sigma \text{ Blancos}) / \text{Sensibilidad}$$

Sería la concentración mínima del analito (Hg) que puede ser detectada con la técnica analítica empleada. El resultado obtenido es el siguiente:

$$\text{Límite de detección} = (3 * 164) / 14191 = 0,0348 \text{ ng}$$

- **Límite de cuantificación:** El límite de cuantificación se rige por la siguiente fórmula:

$$\text{Límite de cuantificación} = (10 * \sigma \text{ Blancos}) / \text{Sensibilidad}$$

Sería la concentración mínima del analito (Hg) que se puede cuantificar de forma segura sin introducir errores significativos.

$$\text{Límite de cuantificación} = (10 * 164) / 14194 = 0,1158 \text{ ng}$$

#### 5.4.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Aunque una práctica habitual es ajustar diariamente durante el experimento la recta de calibrado utilizando los patrones y ajustando valores de la recta de la *Figura 2*, en este caso no se realizó tal proceso debido a que se presentaba bastante uniformidad entre las medidas obtenidas en la realización de la recta y las mediciones posteriores de los patrones. Por lo tanto, la recta empleada es la mostrada anteriormente

Cada muestra fue tomada del congelador y pesada en una balanza analítica. La masa de las muestras oscila entre los 0,0550 g y los 0,0850 g. El peso exacto de las muestras fue introducido dentro del software del equipo Hydra IIc según se muestran en las *Tablas 8 y 9*. Se optó por coger este margen de masas ya que eran aquellos que mejor se acomodaban al rango de medición de la recta de calibrado mostrada en la *Figura 2*. Las muestras son dispuestas en una navelilla de níquel e introducidas al equipo.

Cada una de las muestras fue medida 5 veces para obtener la máxima representatividad de los resultados posible y sus resultados fueron interpolados en la ecuación de la recta. Los resultados son representados en contenido de mercurio en ng respecto del peso de la muestra introducida al equipo, contenido de mercurio respecto de 100 gramos de muestra como ración estimada de consumo diario y sus desviaciones estándar.

## 6. RESULTADOS

Todos los valores serán evaluados a partir del blanco de cada una de las muestras. Para comprobar que existe diferencia estadística entre el blanco y los distintos tipos de cocinado, se ha aplicado el test t de Student en todos los casos y se han propuesto unas conclusiones a partir de ello.

En cada tabla según las condiciones de cocinado, se comprueba si el valor crítico de t de Student para dos colas, en este caso para 5 unidades muestrales y un grado de libertad del 95% ( $n - 1 = 4$ ), es superior a (2,78) para declarar que existe diferencia significativa y por lo tanto (si el valor obtenido es demasiado menor que el del blanco) que el cocinado es eficaz para la reducción de mercurio.

### 6.1. COCINADO CON ACEITES DE OLIVA Y SEMILLAS.

#### 6.1.1. ACEITES EN DORADA

Tabla 8: Contenido de mercurio en la dorada (ng), la concentración total en ppb y en mg/100g de muestra y el valor de t de Student aplicando un cocinado con aceites.

	Hg (ng)	Concentración (ppb)	Concentración media (ppb)	Concentración (mg/ 100 g)	Valor del test t de Student
Dorada B	8,1771	111,41	116,02 ± 22,54	0,0116 ± 0,0023	-
	9,3817	108,08			
	8,9214	105,21			
	7,8230	99,78			
	11,4997	155,61			
AS2'dorada	9,5768	126,34	128,62 ± 5,05	0,0129 ± 0,0005	-1,21
	10,6309	127,62			
	9,1507	129,25			
	7,5011	123,17			
	7,6291	136,72			
AS4'dorada	6,9209	118,51	113,78 ± 4,35	0,0114 ± 0,0004	0,21
	6,9929	115,58			

	7,0423	107,35			
	6,4986	111,66			
	7,2033	115,81			
A02'dorada	6,0006	80,01	90,62 ± 7,07	0,0091 ± 0,0007	2,40
	8,6233	98,89			
	6,8838	94,69			
	7,5167	89,17			
	7,4162	90,33			
A04'dorada	8,9181	145,01	143,63 ± 14,14	0,0144 ± 0,0014	-2,32
	10,1855	166,43			
	7,2418	139,53			
	7,1242	128,13			
	8,0358	139,03			

Para este tipo de cocinado en la dorada no se ha podido evidenciar ningún cambio significativo. De hecho, a pesar de buscar una reducción en el contenido de mercurio con los cocinados, en este caso, llega a subir ligeramente su contenido en algunos casos. Este resultado puede haberse dado debido a que el mercurio obtiene mayor estabilidad cuando se encuentra en un medio graso, la misma forma en la que se bioacumula en la cadena trófica marina por lo que puede ser que el mercurio no sea tan fácilmente liberado.

### 6.1.2. ACEITES EN PALOMETA

Tabla 9: Contenido de mercurio en la palometa (ng), la concentración total en ppb y en mg/100g de muestra y el valor de t de Student aplicando un cocinado con aceites.

	Hg (ng)	Concentración (ppb)	Concentración media (ppb)	Concentración (mg/ 100 g)	Valor del test t de Student
Palometa B	4,7478	64,68	56,03 ± 9,42	0,0056 ± 0,0009	-
	3,8327	44,16			
	4,6743	55,12			
	3,9233	50,04			
	4,8880	66,14			
AS2' palometa	5,0257	66,30	66,02 ± 15,84	0,0066 ± 0,0016	-1,21
	4,9751	59,73			
	3,0333	42,84			
	4,8708	79,98			

	4,5347	81,27			
AS4' palometa	5,3165	91,04	87,38 ± 4,43	0,0087 ± 0,0004	-6,74
	4,8966	80,94			
	6,0303	91,93			
	5,0823	87,32			
	5,3307	85,70			
A02' palometa	4,7655	63,54	65,36 ± 11,45	0,0065 ± 0,0011	-1,41
	4,6866	53,75			
	5,4675	75,21			
	4,6586	55,26			
	6,4901	79,05			
A04' palometa	4,8850	79,43	94,09 ± 9,14	0,0094 ± 0,0009	-6,49
	5,8486	95,57			
	5,4016	104,08			
	5,4561	98,13			
	5,3889	93,23			

De la misma forma que ha ocurrido con el caso anterior, no parece que ocurra una reducción significativa del contenido de mercurio. Para declarar que el contenido de mercurio se ha reducido el valor obtenido debe de ser inferior al del blanco y el valor de t superior a 2,78. En este caso, el valor absoluto de t supera el valor crítico en varios casos, pero el valor obtenido es superior al del blanco. Lo que significa que hay un aumento significativo del contenido de mercurio y no una disminución (AS4' palometa, A04' palometa). La causa de este resultado puede debido a las mismas razones que en la dorada, el mercurio al encontrarse en un medio graso adquiere estabilidad a que los procesos térmicos lo emitan al medio. Además, dentro de este estudio, no se ha determinado cual es la posible contaminación dada por los aceites usados lo que podría estar aumentando los resultados de mercurio obtenidos.

## 6.2.COCINADO CON ÁCIDO CÍTRICO

### 6.2.1. ÁCIDO CÍTRICO EN DORADA

Tabla 10: Contenido de mercurio en la dorada (ng), la concentración total en ppb y en mg/100g de muestra y el valor de t de Student aplicando un cocinado con ácido cítrico.

	Hg (ng)	Concentración (ppb)	Concentración media (ppb)	Concentración (mg/ 100 g)	Valor del test t de Student
Dorada B	8,1771	111,41	116,02 ± 22,54	0,0116 ± 0,0023	-
	9,3817	108,08			
	8,9214	105,21			
	7,8230	99,78			
	11,4997	155,61			
C1dorada	5,8109	76,66	91,36 ± 16,97	0,0091 ± 0,0017	1,95
	6,3283	75,97			
	6,1807	87,30			
	6,1757	101,41			
	6,4439	115,48			
C2dorada	6,1368	105,08	110,56 ± 4,62	0,0111 ± 0,0005	0,53
	6,8600	113,39			
	6,9901	106,56			
	6,7528	116,03			
	6,9502	111,74			
C3dorada	5,2671	70,23	74,84 ± 11,36	0,0075 ± 0,0011	3,65
	4,9956	57,29			
	6,1547	84,66			
	6,6072	78,39			
	6,8692	83,67			

Con el cocinado con ácido cítrico, parece haber una reducción significativa en la muestra C3dorada ( $t_{C3D} 3,65 \geq 2,78$ ). Con el resto de las concentraciones también parece que se reduce ligeramente el contenido de mercurio, pero sin llegar a los valores de la muestra con mayor concentración. Estas condiciones de cocinado podrían resultar de interés para reducir el contenido de mercurio, pero habría que hacer un estudio más prolongado

modificando de forma paralela los tiempos de cocción y si la acidez del medio resulta aceptable para su consumo.

### 6.2.2. ÁCIDO CÍTRICO EN PALOMETAS

Tabla 11: Contenido de mercurio en la palometa (ng), la concentración total en ppb y en mg/100g de muestra y el valor de t de Student aplicando un cocinado con ácido cítrico.

	Hg (ng)	Concentración (ppb)	Concentración media (ppb)	Concentración (mg/ 100 g)	Valor del test t de Student
Palometa B	4,7478	64,68	56,03 ± 9,42	0,0056	-
	3,8327	44,16			
	4,6743	55,12			
	3,9233	50,04			
	4,8880	66,14			
C1palometa	4,5317	59,78	80,62 ± 21,64	0,0081 ± 0,0022	2,32
	4,8729	58,50			
	5,8606	82,78			
	5,6944	93,50			
	6,0568	108,54			
C2palometa	4,0144	68,74	76,31 ± 9,03	0,0076 ± 0,0009	3,48
	4,6765	77,30			
	4,3359	66,10			
	4,7365	81,38			
	5,4768	88,05			
C3palometa	4,4986	59,98	56,60 ± 5,33	0,0057 ± 0,0005	0,12
	4,2760	49,04			
	4,4036	60,57			
	4,4580	52,88			
	4,9700	60,54			

A diferencia que, en el caso de la palometa cocinada con ácido cítrico, parece que la tendencia es a la inversa, el contenido de mercurio parece aumentar siendo el caso de C2palometa el significativamente diferente del blanco ( $t_{C2P} | 3,48 | \geq 2,78$ ). Debido a que las desviaciones estándar de las muestras son tan amplias, es difícil esclarecer con seguridad con tan pocos datos si existe una causa consecuencia con el cocinado bajo estas

condiciones y la palometa. En un principio y en vistas de los resultados, el cocinado con ácido cítrico, no es un método fiable para la reducción de mercurio.

### 6.3.COCINADO CON SALMUERA

#### 6.3.1. SALMUERA EN DORADA

Tabla 12: Contenido de mercurio en la dorada (ng), la concentración total en ppb y en mg/100g de muestra y el valor de t de Student aplicando un cocinado con una salmuera.

	Hg (ng)	Concentración (ppb)	Concentración media (ppb)	Concentración (mg/ 100 g)	Valor del test t de Student
Dorada B	8,1771	111,41	116,02 ± 22,54	0,0116 ± 0,0023	-
	9,3817	108,08			
	8,9214	105,21			
	7,8230	99,78			
	11,4997	155,61			
S1dorada	7,7811	102,65	132,39 ± 33,26	0,0132 ± 0,0033	0,91
	8,1669	98,04			
	9,0783	128,22			
	9,9769	163,82			
	9,4414	169,20			
S2dorada	6,8238	116,85	114,31 ± 6,71	0,0114 ± 0,0007	0,16
	6,8189	112,71			
	6,8730	104,77			
	6,6331	113,97			
	7,6658	123,25			
S3dorada	4,1363	55,15	69,23 ± 12,61	0,0069 ± 0,0013	4,05
	4,9209	56,43			
	6,0139	82,72			
	6,4988	77,09			
	6,1351	74,73			

Los resultados para las concentraciones de sal S1 y S2 no reflejan diferencias significativas mientras que la concentración S3 sí lo hace ( $t_{S3D} 4,05 \geq 2,78$ ). Bajo este contexto, parece que, utilizando concentraciones elevadas de sal para el cocinado de la

dorada, el contenido de mercurio disminuye mientras que, a partir de cierto umbral de concentración, no hay variaciones evidentes.

### 6.3.2. SALMUERA EN PALOMETA

Tabla 13: Contenido de mercurio en la palometa (ng), la concentración total en ppb y en mg/100g de muestra y el valor de t de Student aplicando un cocinado con una salmuera.

	Hg (ng)	Concentración (ppb)	Concentración media (ppb)	Concentración (mg/ 100 g)	Valor del test t de Student
Palometa B	4,7478	64,68	56,03 ± 9,42	0,0056 ± 0,0009	-
	3,8327	44,16			
	4,6743	55,12			
	3,9233	50,04			
	4,8880	66,14			
S1palometa	5,2116	68,75	69,27 ± 14,63	0,0069 ± 0,0015	1,70
	3,9544	47,47			
	4,6681	65,93			
	4,7271	77,62			
	4,8319	86,59			
S2palometa	4,7709	81,69	69,77 ± 15,19	0,0070 ± 0,0015	1,72
	5,2902	87,44			
	3,6792	56,09			
	4,1082	70,59			
	3,2978	53,02			
S3palometa	4,2351	56,47	56,72 ± 5,83	0,0057 ± 0,0006	0,12
	4,1464	47,55			
	4,6324	63,72			
	4,8858	57,96			
	4,7546	57,91			

Para el caso de la sal en la palometa, no hay ningún aumento ni disminución significativo respecto del blanco en el mercurio, aunque por tendencia y necesitando realizar más análisis, parece que la tendencia es similar al caso de la dorada, durante las dos primeras concentraciones de sal, el valor del mercurio es similar, mientras que a partir de la concentración S3, el contenido de mercurio tiende a la baja.

## 7. CONCLUSIONES

Se van a evaluar dos tipos de conclusiones. El primero ataÑe a las dificultades, inconvenientes y virtudes que el propio desarrollo experimental ha llevado consigo mismo. El segundo va a ser una conclusión sobre los resultados obtenidos y si se han completado los objetivos establecidos.

El estudio se enfrentó a algunas dificultades en el momento de su planteamiento. Por ejemplo, reducir el contenido de mercurio de especies que se presuponen que su contenido no va a ser elevado, puede provocar que haya otras injerencias que se evidencien de forma más abultadas en los resultados. Por adición a esto, no se realizó un análisis del mercurio de los ingredientes empleados como el aceite.

Los resultados obtenidos en general tienen desviaciones estándar muy amplias que en muchos casos no permiten evidenciar cambios significativos entre las muestras. Para comprobar si los tipos de cocinado empleados han sido útiles, habría que hacer un estudio paralelo que use más unidades muestrales en aquellos cocinados sin diferencias significativas. A pesar de esto, el estudio abordó una gran cantidad de datos y ha permitido sacar las siguientes conclusiones:

Los aceites no parecen ser una buena forma de reducir el contenido de mercurio en ninguna de las dos especies de pescado y puede deberse a dos razones. La primera es qué el mercurio es más estable a los procesos térmicos en medio graso y segundo, que se incorporó más mercurio a la matriz del alimento al usar el aceite como ingrediente. Por lo que se determina que el cocinado con aceites no es una buena forma de reducir el contenido de mercurio,

Para el ácido cítrico, los resultados son algo más confusos. Mientras que en la dorada el contenido de mercurio disminuye significativamente a la máxima concentración, el

contenido de mercurio en la palometa aumenta en C2. Una posible explicación de este resultado es debido a lo explicado anteriormente, el contenido de mercurio en la palometa es muy reducido en sí mismo y el que tiene se encuentra muy fuertemente ligado. Por eso en ningún cocinado empleado, el contenido de mercurio en la palometa se ha reducido. Aunque habría que ampliar el campo de estudio para este tipo de cocinado evaluando el pH y no solo la concentración y probándolo en otras especies de pescado, podría ser una buena forma de reducir la contaminación por mercurio.

En la salmuera se han mostrado los resultados más prometedores, habiendo una reducción de casi la mitad del contenido de mercurio en la dorada en el cocinado con la mayor concentración (S3). En la palometa los resultados se han mantenido estables, sin desviaciones significativas que pueden darse debido a lo explicado anteriormente. Estas condiciones para el cocinado podrían ser útiles para la reducción del mercurio.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN): Recomendaciones de consumo de pescado para poblaciones sensibles debido a la presencia de mercurio, 2011

Directiva 79/117/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1978, relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas.

Edwards GN. 1865. Two cases of poisoning by mercuric methide. *Saint Bartholomew's Hosp Rep* 1:141–150

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. (2004) DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.34>

FAO/OMS. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-first meeting. (2003). Rome 10-19 June 2003. Summary and Conclusions.

Fitzgerald W.F., Clarkson T.W. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environ Health Perspect*. 1991 Dec; 96:159–166.

Grandjean P, Satoh H, Murata K, Eto K. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ Health Perspect*. 2010 Aug;118(8):1137-45. doi: 10.1289/ehp.0901757. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20529764; PMCID: PMC2920086.

Herrman JL, Younes M. Background to the ADI/TDI/PTWI. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1999 Oct;30(2 Pt 2): S109-13. doi: 10.1006/rtph.1999.1335. PMID: 10597623.

N.A. Panichev, S.E. Panicheva, Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry, Food Chemistry, Volume 166, 2015, Pages 432-441, ISSN 0308-8146,  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.032>.

NEP. Global Mercury Assessment 2013: Sources, emision, releases and environmental transport. Geneva: UNEP Chemicals Branch, 2013

Panichev, N. A., & Panicheva, S. E. (2015). Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry. Food chemistry, 166, 432-441.

Reglamento (CE) nº 1107/2009 del parlamento europeo y del consejo de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo.

Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo de 21 de octubre de 2009.

Reglamento (UE) 2017/852 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de mayo de 2017, sobre el mercurio y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1102/2008.

Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

Speijers GJ. Precision of estimates of an ADI (or TDI or PTWI). Regul Toxicol Pharmacol. 1999 Oct;30(2 Pt 2): S87-93. doi: 10.1006/rtph.1999.1331. PMID: 10597619.

Teledyne Leeman Labs. A Practical Guide: Selecting the Best Technique for Mercury Measurement. (2017) <https://www.teledyneleemanlabs.com/> (Fecha de revisión: 16/08/2021)

Tsuda, T., Yorifuji, T., Takao, S., Miryai, M., & Babazono, A. (2009). Minamata Disease: Catastrophic Poisoning Due to a Failed Public Health Response. *Journal of Public Health Policy, 30*(1), 54-67.

World Health Organization (WHO). Exposure to Mercury: A Major Public Health Concern. 2007