

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”



Bioacumulación de distintas especies de selenio y sus efectos en organismos marinos

Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:

María Paz Ruiz Azcona

Fecha de lectura: 20 de julio de 2017

Bajo la dirección de los doctores:

Emilio Morales Carrillo de Albornoz

Marcelino Herrera Domínguez

Huelva, 2017



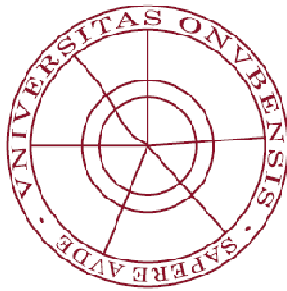


Bioacumulación de distintas especies de selenio y sus efectos en organismos marinos

Tesis Doctoral

2017

M^a PAZ RUIZ AZCONA



Universidad de Huelva
Facultad de Ciencias Experimentales

M^a Paz Ruiz Azcona

**Tesis presentada para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Huelva**

2017

Directores:

Dr. Emilio Morales Carrillo de Albornoz

Profesor Titular de Universidad
Departamento de Química "Prof. J.C.
Vílchez Martín"
Universidad de Huelva

Dr. Marcelino Herrera Rodríguez

Investigador
Centro IFAPA Agua del Pino

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor por la Licenciada:

Fdo.: M^a Paz Ruiz Azcona



D. EMILIO MORALES CARRILLO DE ALBORNOZ, Profesor Titular del Departamento de Departamento de Química “Prof. J.C. Vilchez Martín” y D. MARCELINO HERRERA RODRÍGUEZ, Investigador del Centro IFAPA Agua del Pino,

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria de tesis doctoral titulada “BIOACUMULACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES DE SELENIO Y SUS EFECTOS EN ORGANISMOS MARINOS”, que presenta la licenciada D^a. M^a PAZ RUIZ AZCONA para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Huelva, dentro del Programa de Doctorado: Ciencia y Tecnología Química, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos legales exigidos, por lo que puede pasar a su defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Huelva, a veintitrés de mayo de dos mil diecisiete.

Dr. Emilio Morales Carrillo de Albornoz

Dr. Marcelino Herrera Rodríguez

Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia e Innovación y a los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), ya que parte de los resultados presentados en esta memoria han sido llevados a cabo dentro del proyecto “Biosíntesis de compuestos de selenio con propiedades terapéuticas en organismos marinos con fines alimenticios (CTQ2009-11349), cofinanciado por ambos organimo

Al Programa Operacional de Cooperación Transfronteriza España-Portugal 2014-2020 (POCTEP) dentro del proyecto “Red transfronteriza para el desarrollo de productos innovadores con microALGAs (0055_ALGARED_PLUS_5_E)” cofinanciado por Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER)

A la empresa Salinas del Astur (Ayuntamiento de Punta Umbría) y a su técnico Rafael Rodríguez Sierra, gracias a los cuales se han podido realizar los experimentos para llevar a cabo este trabajo.

RESUMEN

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial gracias a su presencia en las proteínas, además de presentar un efecto antagónico frente a elementos tóxicos. Es necesario en los seres humanos en cantidades menores de $100 \mu\text{g día}^{-1}$, sin embargo, las diferencias entre su deficiencia, ingesta apropiada y toxicidad son muy leves, siendo la dosis máxima tolerable de Se de $300 \mu\text{g Se día}^{-1}$.

La ruta de entrada de Se en los organismos se realiza mediante la absorción directa y, principalmente, a través de la cadena trófica. Por otro lado, en la alimentación humana, los moluscos bivalvos tienen una gran importancia por su alto valor nutricional y su aporte de elementos esenciales. Por lo tanto, se considera importante realizar investigaciones sobre suplementación con Se en especies de interés acuícola, y evaluar las fuentes del elemento, biodisponibilidad y su biotransformación.

En este trabajo se han realizado experiencias de acumulación, biotransformación y eliminación de varias especies de Se (selenito, selenometionina y selenometilselenocisteína), en un organismo filtrador de interés acuícola, la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), y realizando el seguimiento del Se a partir del agua y del alimento (microalgas), en sistemas de renovación diaria del agua. El rango de concentraciones ensayadas fue $0-1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $0-50 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $0-25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ y $0,042-4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$, para el selenito (Se(IV)), selenometionina (SeMet) y selenometilselenocisteína (SeMetSeCys) y microalgas (Se-Tiso), respectivamente, con un tiempo de exposición de 120 días. La experiencia de eliminación se realizó durante 60 días con almejas previamente expuestas (60 días) a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ y $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ de Se(IV), SeMet, SeMetSeCys y Se-Tiso, respectivamente. Se ha estudiado el Se total y la especiación en el cuerpo blando de la almeja, los tejidos (manto, pie, vísceras, branquias y hepatopáncreas) y a nivel subcelular, distinguiendo entre el contenido biológicamente activo y no activo. Al mismo tiempo se han realizado estudios de efectos en mortalidad y subletales, dependientes del nivel de concentración y del tipo de especie de Se utilizado.

Los resultados mostraron que la mortalidad de las almejas fue del 100 % a los 28, 7 y 21 días de exposición a $1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de Se(IV), de SeMet y SeMetSeCys, respectivamente, siendo del 35% para los grupos de almejas alimentadas con Se-Tiso a los 60 días. Respecto a los efectos fisiológicos, mostraron que la tasa de aclaramiento disminuye respecto al control en los grupos de almejas expuestas a las

concentraciones más altas a partir de los 7- 14 días, no observándose diferencias significativas en las almejas expuestas a Se-Tiso. En general, la actividad enzimática de la GST, disminuyó y la de GPx, aumentó en los grupos de almejas tratadas con Se respecto al control.

La acumulación de Se total en el cuerpo entero y en los distintos tejidos de las almejas se ajustaron a modelos cinéticos de primer orden, con factores de bioconcentración (BCFs) incrementando en el siguiente orden: Se(IV) < SeMetSeCys < SeMet. Los factores de transferencia trófica de las almejas tratadas con Se-Tiso se encontraron en el rango entre 3,75 y 16,5. Así mismo, la distribución del Se en los distintos tejidos incrementó en el siguiente orden: pie = manto < vísceras < branquias < hepatopáncreas. Las distintas fracciones subcelulares de las branquias y hepatopáncreas mostraron que entre el 35% y 81% del Se se encuentra en las fracciones biológicamente detoxificadas (máxima, en proteínas estables al calor), mientras que por debajo del 28% del Se se encuentra en la fracción biológicamente activa (principalmente en mitocondrias). La eliminación del Se se ajustó a modelos cinéticos de uno y dos compartimentos, siendo vida media de eliminación en el cuerpo completo entre 1 y 10 días y entre 23 y 46 días a corto y largo plazo para todos los tratamientos, respectivamente.

Por último, se identificaron tres especies conocidas de Se (Se(IV), SeMet, SeMetSeCys) y cuatro especies desconocidas (U1, U2, U3, U4) para el cuerpo completo, tejidos y fracciones subcelulares. Las especies conocidas suponen entre 4-16%, 7-27%, 31-66%, 6-29% en las almejas expuestas a selenito, SeMet, SeMetSeCys y alimentadas con Se-Tiso, respectivamente. SeMetSeCys fue detectada en todos los grupos de almejas, Se(IV) en los expuestas a Se(IV), SeMet y SeMetSeCys, y solamente se detectó SeMet en las almejas expuestas a SeMet.

ABSTRACT

Selenium (Se) is present in proteins and has an antagonistic effect against toxic elements, what makes it an essential trace element. Human beings need Se in quantities smaller than $100 \mu\text{g day}^{-1}$. However, differences between its deficiency, appropriate intake and toxicity are rather slight, being $300 \mu\text{g Se day}^{-1}$ the maximum tolerable dose.

Living organisms take Se by direct absorption, mainly through the trophic chain. On the other hand, bivalve molluscs are of great relevance for the human diet, due to having a high nutritional value as well as a high quantity of essential elements. It is thus important to do research concerning Se supplementation in species of aquatic interest.

In this work, the bioaccumulation, biotransformation and elimination of several species of selenium were investigated in a filtering organism of aquatic interest (*Ruditapes decussatus* clams). *R. decussatus* were exposed to a daily renewal protocol with dissolved selenite (Se(IV)), selenomethionine (SeMet) and seleno-methylselenocysteine (SeMetSeCys), and to a microalgae (Se-Tiso) diet for a period of 120 days. The concentration range was $0\text{-}1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $0\text{-}50 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $0\text{-}25 \mu\text{g Se L}^{-1}$, and $0,042\text{-}4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Se(IV), SeMet, SeMetSeCys and Se-Tiso, respectively. Elimination was studied for clams previously exposed to $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ y $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ of Se(IV), SeMet, SeMetSeCys and Se-Tiso, respectively. Time of exposure was 60 days. The total amount of Se was determined, as well as its speciation in clams' soft body and tissues (mantle, foot, gut, gill and hepatopancreas). The amount of Se was also determined at the sub-cellular level, distinguishing between the biologically active and non-active content. Additionally, other parameters were determined, as those of mortality and sublethal effects. These latter depended on the level of concentration and on the type of Se used.

Results showed a mortality rate of 100% for those clams exposed to $1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$ Se(IV), $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ SeMet, $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ and SeMetSeCys of Se(IV) at 28, 7 and 21 days, respectively. For clams fed with Se-Tiso, the mortality rate was of 35% at 60 days. Regarding physiological effects, clarification rate decreased with respect to the control in those groups of clams which had been exposed to the highest concentrations from 7-14 days on. No significant differences were found for the group of clams with Se-Tiso. Overall, GST enzyme activity decreased and that of GPx increased in those groups of clams treated with Se.

Total accumulation of Se in whole-body and in the different clam tissues conformed to first-rate kinetic models, displaying increasing bioconcentration factors (BCFs) in the following order: Se(IV) < SeMetSeCys < SeMet. Trophic transfer factors for clams fed with Se-Tiso were in the range of 3,75-16,5. Likewise, Se distribution in tissues increased as follows: foot = mantle < gut < gill < hepatopancreas. The different sub-cellular sections of gill and hepatopancreas showed that between 35% and 81% of Se is found in biologically-detoxified areas (maximum heat stable proteins). On the other hand, less than 28% of Se is found in biologically-active areas (mainly in mitochondria). Elimination of Se conformed to one- and two-compartment kinetic models. The biological half-life values of elimination in whole-body were between 1 and 10 days and between 23 and 46 days in the short and long term for all treatments, respectively.

Finally, three known species of Se (Se (IV), SeMet, SeMetSeCys) and four unknown species (U1, U2, U3, U4) were identified for the whole body, tissues and sub-cellular sections. Known species account for between 4-16%, 7-27%, 31-66%, and 6-29% in clams exposed to selenite, SeMet, SeMetSeCys and fed with Se-Tiso, respectively. SeMetSeCys was detected in all groups of clams. Se (IV) was only detected in those groups of clams exposed to Se (IV), SeMet and SeMetSeCys. For clams exposed to SeMet, only this latter was detected.

ABREVIATURAS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AE	Eficiencia de asimilación
AB	Fracción activa biológicamente
AED	Cromatografía de gases que utilizan la emisión atómica
AES	Espectrometría de emisión atómica
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
ANFACO	Asociación Nacional de Fabricantes de Conservas de Pescados y Mariscos
APROMAR	Asociación Empresarial de Acuicultura de España
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
BAF	Bioacumulación
BCF	Bioconcentración
BHT	Hidroxitolueno butilado
C ₀	Concentración de selenio a tiempo cero
C _{0l}	Concentración de selenio a tiempo cero para una componente de vida media larga
C _{0s}	Concentración de selenio a tiempo cero para una componente de vida media corta
C ₁	Densidad celular que corresponde la concentración inicial de cada intervalo de tiempo
C ₂	Densidad celular que corresponde la concentración final de cada intervalo de tiempo
C _d	Concentración de la sustancia química en la dieta
C _{heces}	Concentración del tóxico retenida en las heces
C _{org}	Concentración del tóxico en el organismo
C _t	Concentración de selenio a tiempo t
C _w	Concentración de selenio en el agua
CAP	Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía
CE	Electroforesis capilar
COFI	Subcomité de Acuicultura del Comité de Pesca de la FAO
CR	Tasa de aclaramiento (TA, L h ⁻¹ animal ⁻¹)
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
DDT	Ditiotreitol
DB	Fracción detoxificada biológicamente
DE-Se	Dietilselenio
DMSe	Dimetilselenio

DMDSe	Dimetildiselenio
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracetato
EEUU	Estados Unidos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
EI	Ionización electrónica
EI-MS	Espectrometría de ionización con electrospray
ET-AAS	Cromatografía líquida basada en la absorción atómica electrotérmica
F-AAS	Cromatografía líquida basada en la absorción atómica de llama
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FIA	Analizador de inyección de flujo
FID	Cromatografía de gases que utilizan el detector fotométrico de llama
GC	Cromatografía de gases
GPx	Glutación peroxidasa
GPx-Se	Glutación peroxidasa Se-dependiente
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación oxidado
GSSG	Concentraciones de glutación reducido
GST	Glutación S-transferasa
HCC	Cánceres de hígado
HDTA	Fosfato de hexadeciltriethylamonio
HG	Generación de Hidruro de selenio
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP-AES	Espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma
IDI	Yodotironina Deiodinasas
IFAPA	Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica, Junta de Andalucía
IOM	Institute of Medicine de Estados Unidos
IR	Tasa de ingestión a través de la dieta
K_d	Constante de depuración
K_e	Constante de la velocidad de eliminación del tóxico del organismo
K_a	Constante de la velocidad de absorción del tóxico
LC50	Concentración letal 50

LD50	Dosis letal 50
LOD	Límites de detección
LOQ	Límites de cuantificación
LPO	Peroxidación lipídica
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MALDI	Espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
MDA	Malondialdehído
MERAG	Metals Environment Risk Assessment Guidance (International Council on Mining and Metals (Reino Unido))
MS	Espectrometría de masas
NAA	Análisis de activación de neutrones
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PS _{ORG}	Peso seco del organismo
PTV	Sistema de temperatura de vaporización programable
R	Regresión lineal
R1	Reactivo 1
R2	Reactivo 2
ROS	Especies de oxígeno reactivo
SBSE	Extracción por absorción sobre barra agitada
SDS	Surfactantes
Se(IV)	Selenito
Se(VI)	Selenato
SeCys	Selenocisteína
SeMet	Selenometionina
SePP	Selenoproteína P
SIM	Modo de seleccionador de iones
t	Período de exposición
t _{1/2}	Vida media de eliminación
TA	Tasa de aclaramiento
TAM	Biodisponibilidad trófica del selenio
TD	Desorción térmica en línea acoplada
TE50	Tasa de enterramiento
Tiso	Microalga <i>Isochrysis galbana</i> clon T-Iso

TIC	Modo de control de ion total
TMOP	Malondialdehído como acetal
TTAB	Bromuro de trimetiltetradecilamonio
TTAOH	Hidróxido de trimetiltetradecilamonio
TTF	Factor de transferencia trófica
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Volumen del agua
VIH	Virus de la inmunodeficiencia adquirida
WHO	World Health Organization (OMS)

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL SELENIO	1
1.1.1. EL SELENIO COMO ELEMENTO QUÍMICO.....	1
1.1.2. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL SELENIO.....	3
1.1.2.1. <i>Las selenoproteínas</i>	4
1.1.2.2. <i>Deficiencia y toxicidad del selenio</i>	6
➤ Deficiencia	8
➤ Toxicidad	9
➤ Beneficios del selenio en la salud humana	11
1.1.3. DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA DEL SELENIO EN EL MEDIO NATURAL .	11
1.1.3.1. <i>Aire</i>	12
1.1.3.2. <i>Agua</i>	12
1.1.3.3. <i>Suelos y sedimentos</i>	14
1.1.3.4. <i>Biota</i>	15
1.1.3.5. <i>Organismos marinos</i>	19
1.1.4. ALIMENTOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO	23
1.2. LA ALMEJA FINA, <i>RUDITAPES DECUSSATUS</i> (LINNAEUS, 1758)	26
1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	26
1.2.1.1. <i>Taxonomía y morfología</i>	26
1.2.1.2. <i>Anatomía y fisiología</i>	27
1.2.1.3. <i>Distribución y hábitat</i>	29
1.2.2. LOS MOLUSCOS BIVALVOS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA.....	30
1.2.3. LA PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS.....	31
1.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE ACUMULACIÓN DE METALES EN MATRICES BIOLÓGICAS	34
1.3.1. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN A METALES	34
1.3.2. CINÉTICA DE LA BIOACUMULACIÓN.....	36
1.3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINACIÓN DE SELENIO. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	41
1.3.3.1. <i>Determinación de Se total</i>	41
1.3.3.2. <i>Especiación de selenio</i>	42

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	53
3.1.1. CULTIVOS DE ALMEJA FINA (<i>RUDITAPES DECUSSATUS</i>).....	53
3.1.1.1. <i>Condiciones del cultivo</i>	53
3.1.1.2. <i>Acumulación de selenio</i>	57
➤ Exposición al Se a través del medio acuático (vía agua)	57
➤ Exposición al Se a través de la dieta (vía alimento)	58
➤ Protocolo de exposición	59
3.1.1.3. <i>Eliminación del selenio (depuración)</i>	60
3.2. METODOLOGÍA DE MUESTREO	60
3.2.1. PERIODICIDAD.....	60
3.2.2. VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EN EL CULTIVO	60
3.2.3. ACUMULACIÓN Y ELIMINACIÓN (DEPURACIÓN).....	61

3.2.3.1. Agua de cultivo	61
3.2.3.2. Almejas	61
➤ Cuerpo blando completo	61
➤ Tejidos.....	61
3.3. PARÁMETROS ESTUDIADOS.....	62
3.3.1. ACUMULACIÓN Y ELIMINACIÓN DE SELENIO.....	62
3.3.1.1. Selenio total.....	62
3.3.1.2. Especies de selenio.....	63
3.3.1.3. Cinética de acumulación y depuración de selenio.....	63
➤ Bioconcentración de selenio desde el agua.....	63
➤ Bioconcentración de selenio desde la dieta.....	63
➤ Depuración del selenio.....	64
3.3.2. MORTALIDAD	65
3.3.3. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	65
3.3.3.1. Tasa de aclaramiento	65
3.3.3.2. Actividad enzimática	66
➤ Preparación de los extractos.....	66
➤ Análisis enzimáticos	67
➤ Determinación de proteínas totales.....	69
3.3.3.3. Enterramiento.....	70
3.4. PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN SUBCELULAR.....	70
3.5. ANÁLISIS DEL SELENIO TOTAL Y ESPECIACIÓN.....	73
3.5.1. REACTIVOS	73
3.5.2. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO.....	73
3.5.2.1. SBSE-TD-GC-MS: Extracción por absorción sobre barra agitada – termodesorción – cromatografía de gases - espectrometría de masas	73
3.5.2.2. HPLC-TR- UV-HG-AFS: Cromatografía líquida de alta resolución – termoreducción – ultravioleta - generación de hidruros - espectroscopia de fluorescencia atómica.....	75
3.5.2.3. FIA-TR-UV-HG-AFS: Analizador de inyección de flujo -termorreducción- ultravioleta - generación de hidruros - espectroscopia de fluorescencia atómica.....	78
3.5.2.4. ICP-MS: Espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas	78
3.5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE SELENIO.....	79
3.5.4. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO (ESPECIACIÓN)	80
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	82

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

ENSAYOS PRELIMINARES	85
4.1. SELENITO A TRAVES DEL MEDIO ACUÁTICO (VÍA AGUA).....	87
4.1.1. MORTALIDAD	87
4.1.1.1. Selenito ambiental (5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$)	87
4.1.1.2. Selenito a altas concentraciones (250 - 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	87
4.1.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	88
4.1.2.1. Tasa de aclaramiento (TA).....	88
4.1.2.2. Actividad enzimática	89
➤ Selenito ambiental (5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$)	90
➤ Selenito a altas concentraciones (250 - 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	93

4.1.3. ACUMULACIÓN DE SELENITO EN ALMEJA FINA.....	95
4.1.3.1. <i>Selenio total en la almeja fina cultivada con selenito</i>	95
➤ Acumulación de selenio en el cuerpo completo.....	95
➤ Distribución tisular del selenio	98
➤ Distribución subcelular del selenio	101
4.1.3.2. <i>Especiación de selenio en almeja fina cultivada con selenito</i>	102
➤ Especiación de selenio en el cuerpo completo.....	103
➤ Especiación de selenio en los tejidos	105
➤ Distribución subcelular del selenio en los tejidos.....	106
4.1.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENITO EN LAS ALMEJAS.....	107
➤ Eliminación del Se en el cuerpo completo.....	108
➤ Eliminación del Se en los tejidos	109
➤ Especiación del Se	111
4.2. SELENOMETIONINA A TRAVÉS DEL MEDIO ACUÁTICO.....	112
4.2.1. MORTALIDAD	112
4.2.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	113
4.2.2.1. <i>Tasa de aclaramiento (TA)</i>	113
4.2.2.2. <i>Actividad enzimática</i>	114
4.2.3. ACUMULACIÓN DE SELENOMETIONINA EN ALMEJA FINA.....	115
4.2.3.1. <i>Selenio total</i>	115
➤ Acumulación de Se en el cuerpo completo.....	115
➤ Distribución del Se en los tejidos.....	117
➤ Distribución subcelular del Se en los tejidos	120
4.2.3.2. <i>Especiación de selenio en almeja fina cultivada con selenometionina</i>	121
➤ Especiación de selenio en el cuerpo completo.....	123
➤ Especiación de selenio en los tejidos	124
➤ Distribución subcelular del Se	125
4.2.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENOMETIONINA EN LAS ALMEJAS	
.....	126
➤ Eliminación del Se en el cuerpo completo.....	127
➤ Eliminación del Se en los tejidos	128
➤ Especiación del Se	130
4.3. SELENOMETILSELENOCISTEINA A TRAVÉS DEL MEDIO ACUÁTICO	133
4.3.1. MORTALIDAD	133
4.3.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	133
4.3.2.1. <i>Tasa de aclaramiento (TA)</i>	133
4.3.2.2. <i>Actividad enzimática</i>	134
4.3.3. ACUMULACIÓN DE SELENOMETILSELENOCISTEINA	136
4.3.3.1. <i>Selenio total</i>	136
➤ Acumulación de Se en el cuerpo completo.....	136
➤ Distribución tisular del Se.....	138
➤ Distribución subcelular del Se en el cuerpo completo.....	141
4.3.3.2. <i>Especiación de selenio en almeja fina cultivada con SeMetSeCys</i>	142
➤ Especiación de selenio en el cuerpo completo.....	144
➤ Especiación de selenio en los tejidos	144
➤ Distribución subcelular del Se en los tejidos	145
4.3.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENOMETILSELENOCISTEINA EN	
LAS ALMEJAS	146
➤ Eliminación del Se en el cuerpo completo.....	147
➤ Eliminación del Se en los tejidos	148

➤ Especiación del Se en el cuerpo completo en la eliminación	150
4.4. Isochrysis galbana Clon T-Iso A TRAVÉS DE LA DIETA	153
4.4.1. MORTALIDAD	153
4.4.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	153
4.4.2.1. Tasa de aclaramiento (TA).....	153
4.4.2.2. Actividad enzimática	154
4.4.3. ACUMULACIÓN DE SELENIO A TRAVÉS DE LA DIETA.....	155
4.4.3.1. Selenio total.....	155
➤ Acumulación de Se en el cuerpo completo.....	155
➤ Distribución tisular del Se en el cuerpo completo	157
➤ Distribución subcelular del Se en el cuerpo completo.....	159
4.4.3.2. Especiación de selenio en almejas alimentadas con Tiso enriquecida.....	160
➤ Especiación de selenio en el cuerpo completo.....	161
➤ Especiación de selenio en los tejidos	162
➤ Distribución subcelular del Se en los tejidos	163
4.4.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENIO EN LAS ALMEJAS ALIMENTADA CON MICROALGAS ENRIQUECIDA CON SELENIO	164
➤ Eliminación del Se en el cuerpo completo.....	165
➤ Eliminación del Se en los tejidos	167
➤ Especiación del Se	168

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

5.1. BIOACUMULACIÓN DE SELENIO	173
5.1.1. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	173
5.1.2. BIOACUMULACIÓN DE SE A TRAVÉS DEL AGUA	175
5.1.2.1. Selenio total en el cuerpo completo.....	175
5.1.2.2. Selenio total en los tejidos.....	178
5.1.3. BIOACUMULACIÓN DE SE DESDE LA DIETA.....	180
5.1.4. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL SELENIO	182
5.2. ELIMINACIÓN DEL SELENIO.....	187
5.3. ESPECIACIÓN DEL SELENIO	189

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 8. ANEXOS

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN

1.1. EL SELENIO

1.1.1. EL SELENIO COMO ELEMENTO QUÍMICO

El selenio (Se) fue descubierto en 1817 por el químico J. J. Berzelius al analizar una impureza generada en el proceso de producción de ácido sulfúrico a partir de piritas de cobre (Trofast, 2011). Es un elemento no metálico, del grupo 16 de la tabla periódica, con número atómico 34. Su peso atómico es 78,96 u y tiene 6 isotopos naturales estables: ^{74}Se (0,89%), ^{76}Se (9,37%), ^{77}Se (7,63%), ^{78}Se (23,77%), ^{80}Se (49,61%) y ^{82}Se (8,73%), y un importante isótopo radioactivo emisor de rayos gamma, ^{75}Se , que se utiliza en aplicaciones diagnósticas de la medicina.

Químicamente, el selenio (Se) es muy similar al azufre (S), ambos tienen similar radio covalente y electronegatividad y, al igual que el azufre, presenta varios estados de oxidación (-2, 0, +2, +4, +6), formando gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos (Tabla 1.1), siendo su química compleja en el medioambiente y en los sistemas vivos. Se podría afirmar que la mayoría de sus especies orgánicas contienen Se en estado (-2), encontrándose los estados de oxidación más altos principalmente en especies inorgánicas (Hernández-Mendoza y Ríos-Lugo, 2009).

El Se es altamente sensible a reacciones redox (reducción-oxidación), oxidándose el Se elemental a estado de oxidación +4 o +6. En el estado +4, el selenio está como dióxido de selenio (SeO_2), ácido selenioso (H_2SeO_3) o sales de selenito (SeO_3^{-2}). En el estado +6, el selenio existe como ácido selénico (H_2SeO_4) o sales de selenato (SeO_4^{-2}). Los selenatos y selenitos son las formas inorgánicas más habituales del selenio. La mayoría de las sales de selenato son mucho más solubles que las sales de selenito, siendo su solubilidad y estabilidad mayor en ambientes alcalinos y la conversión de selenatos a selenitos (menos estable) y a selenio elemental, muy lenta. El Se también puede reaccionar con halógenos para formar selenuros en los que se encuentran tanto el Se(IV) como el Se(VI) (SeF_6 ; SeF_4 ; SeCl_4 ; SeBr_4). En su estado más reducido (-2) el selenio existe como selenuro de hidrógeno (H_2Se), que se descompone rápidamente en el aire para formar selenio elemental, y que es bastante soluble en agua; en cambio, los selenuros metálicos tienen baja solubilidad (CuSe , CdSe) o son muy insolubles (HgSe) (NCR, 1983; Martens, 2003). El selenio (-2) es la forma dominante en la química de los compuestos organoselénicos,

encontrándose las principales especies formando parte de las selenoproteínas. Entre los compuestos organoselénicos de interés biológico se encuentran las formas metiladas de selenio, como el dimetil selenio $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ y el ión trimetilselenonio $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$; los selenoaminoácidos (selenocisteína, selenocistina, selenometionina, selenometilselenocisteína, selenohomocistina); y los compuestos de selenio homocíclicos y heterocíclicos (NCR, 1983).

Aunque la química del selenio es similar a la del azufre, los compuestos organoselénicos son más nucleofílicos y más ácidos que los correspondientes compuestos de azufre, por lo que estos elementos se metabolizan de manera diferente. La primera diferencia está en la facilidad de oxidación, el Se(IV) tiende a sufrir reducción y, en cambio el S(IV), oxidación. Por lo tanto, los sistemas biológicos tienden a reducir los compuestos de selenio y a oxidar los compuestos de azufre. En segundo lugar está la diferencia en las fuerzas relativas de los ácidos H_2Se y H_2S , el primero es un ácido mucho más fuerte que el segundo, lo que también se observa en las resistencias ácidas de hidruros de selenio (HSe) y azufre (HS). Esto implica que a pH fisiológico el grupo tiol de la cisteína ($\text{pK} = 8,25$) y de otros tioles existe, esencialmente, en forma protonada, mientras que el grupo selenol en selenocisteína ($\text{pK} = 5,24$) y otros selenoles existe, fundamentalmente, en forma disociada, lo que le hace muy reactivo, siendo catalíticamente más eficiente en las reacciones antioxidantes (Baran, 1990; Wallschläger y Feldmann, 2010; Cupp-Sutton y Ashby, 2016).

Tabla 1.1: Compuestos de selenio de relevancia biológica (Dumont *et al.*, 2006; Bodnar *et al.*, 2012;)

Compuestos Inorgánicos			
<i>Nombre</i>	<i>Valencia</i>	<i>Fórmula química</i>	<i>Análogos del azufre</i>
Selenio elemental	0	Se ⁰	Azufre elemental
Ión seleniuro		Se ²⁻	Ión sulfuro
Ión seleniuro de hidrógeno	-2	HSe ⁻	
Seleniuro de hidrógeno		H ₂ Se	
Seleniuro (metal)		HgSe; ZnSe; CuSe	
Dióxido de selenio		SeO ₂	Dióxido de sulfuro
Ión selenito	+4	SeO ₃ ²⁻	Ión sulfito
Sales de selenito*		Na ₂ SeO ₃ ; Ag ₂ SeO ₃	
Ácido selenoso		H ₂ SO ₃	
Ión selenato		SeO ₄ ²⁻	Ión sulfato
Sales de selenato*	+6	Na ₂ SeO ₄ ; Ag ₂ SeO ₃	
Ácido selénico		H ₂ SO ₄	
Compuestos Orgánicos	-2		
Dimetildiseleniuro		CH ₃ -Se-Se-CH ₃	
Dimetilseleniuro		CH ₃ -Se-CH ₃	
Ión Trimetilselenonio		(CH ₃) ₃ Se ⁺	
Metilselenol		CH ₃ -Se-H	
Se-metilselenocisteína		CH ₃ -Se-CH ₂ -CH(COOH)NH ₂	
γ-glutamil-metil-selenocisteína		CH ₃ -Se-CH ₂ -CH(COOH)-NH-C(O)-CH ₂ -CH ₂ -CH(COOH)NH ₂	
Selenocistationina		NH ₂ (HCOO)CH-(CH ₂) ₂ -Se-CH ₂ -CH(COOH)NH ₂	
Selenohomocistina		NH ₂ (HCOO)CH-CH ₂ CH ₂ -Se-Se-CH ₂ CH ₂ CH(COOH)NH ₂	
Se-adenosil-selenohomocisteína		NH ₂ (HCOO)CH-CH ₂ CH ₂ -Se-CH ₂ -C ₄ H ₅ O ₃ -C ₅ N ₄ NH ₂	
Selenocistina		NH ₂ (HCOO)CH-CH ₂ -Se-Se-CH ₂ -CH(COOH)NH ₂	Cistina
Selenozucares			
Selenometionina		CH ₃ -Se-CH ₂ CH ₂ -CH(NH ₂)COOH	Metionina
Selenocisteína		H-Se-CH ₂ -CH(NH ₂)COOH	Cisteína

* En sus fórmulas químicas se muestran varios ejemplos de este tipo de compuestos.

1.1.2. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL SELENIO.

El selenio es un oligoelemento o elemento traza esencial en todos los organismos vivos, excepto plantas superiores y levaduras. Los elementos traza están presentes en cantidades muy pequeñas en el organismo, en relación con los constituyentes principales de los tejidos, pero son tan importantes como ellos, ya que son imprescindibles para un crecimiento y desarrollo óptimo (Carvalho *et al.*, 2015), y se consideran elementos esenciales para un organismo cuando, al disminuir su exposición por debajo de un cierto límite, implica sistemáticamente una reducción de alguna función fisiológicamente

importante o cuando el elemento forma parte integral de una estructura orgánica que tiene una función vital en el organismo (WHO, 1996). Al mismo tiempo, la toxicidad es inherente a todos los elementos, por lo tanto, puede provocar toxicidad en determinadas concentraciones y condiciones, y será compatible con la vida en un rango menor de exposición (Underwood y Mertz, 1987).

1.1.2.1. Las selenoproteínas

La esencialidad del selenio se debe fundamentalmente a su presencia en las proteínas, ya que es un componente clave para el funcionamiento de una serie de enzimas dependientes de Se, las selenoproteínas (Janz *et al.*, 2010), las cuales desempeñan un papel importante en muchas funciones biológicas, como defensa antioxidante (glutatión peroxidasa), formación de hormonas tiroideas, síntesis de ADN, fertilidad y reproducción. El selenio también actúa, sinérgicamente con la vitamina E, en la función muscular, mejorando la resistencia y la recuperación y frenando el proceso de envejecimiento (Mehdi *et al.*, 2013). Además, presenta un efecto antagónico frente a elementos tóxicos como el mercurio, ya que reduce su toxicidad formando complejos de selenuros metálicos inertes (Rayman, 2000). El efecto anticancerígeno del selenio puede relacionarse con su capacidad para aumentar la respuesta inmune o, más probablemente, con su capacidad para producir metabolitos antitumorógenos como el metilselenol o sus precursores (Rayman, 2000).

Las proteínas que contienen selenio se dividen en tres categorías: proteínas en las que se incorpora de forma inespecífica (principalmente como selenometionina); proteínas específicas con enlaces de Se; y enzimas que incorporan selenocisteína (el 21º aminoácido) en su sitio activo (Patching y Gardiner, 1999; Behne y Kyriakopolis, 2001). Las selenoproteínas son las proteínas que contienen selenocisteína (SeCys), siendo el selenio el único oligoelemento encontrado en las proteínas que es codificado genéticamente, durante su síntesis se incorpora selenocisteína en una ubicación muy específica de la secuencia de aminoácidos, por un proceso de co-traducción que redefine los codones UGA (uracilo/guanina/adenina) para codificarla (Behne y Kyriakopolis, 2001; Hesketh, 2008; Allmang *et al.*, 2009). Además, esta incorporación de Se en las proteínas no es por una simple asociación iónica, como la mayoría de los metales, sino que está unido covalentemente dentro del aminoácido SeCys (López *et al.*, 2011).

El número de selenoproteínas tiene una gran disparidad entre los distintos organismos, así se han detectado en microorganismos marinos más de 3.600 secuencias de genes de selenoproteínas pertenecientes a 58 familias de proteínas (Zhang y Gladyshev, 2008), al menos 15 tipos diferentes de selenoproteínas codificadas por los genomas de bacterias (Kryukov y Gladyshev, 2004) y, en los últimos años, también se han identificado treinta selenoproteínas en 25 genes de mamíferos. En estas últimas la selenocisteína está presente en la selenoproteína una vez por subunidad, excepto en Selenoproteína-P (SelP) que contiene 10 (humano, rata) o 12 (bovino) SeCys en su cadena de polipéptidos (Mostert, 2000; Kryukov *et al.*, 2003). En los últimos años se han identificado unas 30 selenoproteínas en mamíferos, en la tabla siguiente (Tabla 1.2) se muestra un resumen con su función biológica y localización (Kieliszek y Blazejak, 2013; Wrobel *et al.*, 2016).

Tabla 1.2: Selenoproteínas, localización y función biológica.

Selenoproteína	Localización		Funciones
Iodotironina deiodinasa	ID	ER	Regulación de tiroides
Tipo I	ID1	Mem. Plasm.	Producción de T3
Tipo II	ID2	ER	Producción de T3 de manera localizada (intracelular)
Tipo III	ID3	Mem. Plasm.	Degradación de la T3 a diferentes especies inactivas
Glutación citosólica	GPx1	Citosol	Reducción de H ₂ O ₂ e hidroperóxidos orgánicos
Glutación gastrointestinal	GPx2	Citosol	Protección contra hidroperóxidos lipídicos ingeridos
Glutación plasma	GPx3	Plasma	Reducción de H ₂ O ₂ e hidroperóxidos orgánicos
Fosfolípido hidroxidasa	GPx4	Citosol; Mitocondria	Reduce los ácidos grasos hidroperóxidos a fosfolípidos
Tioredoxina reductasa 1	TrxR1	Citosol	Reducción de la forma oxidada de la tioredoxin citosólica
Tioredoxina reductasa 2	TrxR2	Citosol	Formación de enlaces disulfuro durante la maduración del espermatozoide
Tioredoxina reductasa 3		Mitocondria	Reducción de la tioredoxin mitocondrial
Selenofosfato sintetasa	SPS2	Citosol	Síntesis de selenofosfato, precursor de SeCys
Selenoproteína - 15 kDa		ER	Control de correcto plegamiento de proteínas
Selenoproteína - 34 kDa			Movilidad de espermatozoides
Selenoproteína - 18 kDa			Reserva
Selenoproteína H	SelH	Núcleo	Regulación de síntesis de GSH y enzimas detoxificación
Selenoproteína K	SelK	Membrana ER	Contiene propiedades antioxidantes
Selenoproteína M	SelM	ER	Reordenamiento de enlaces disulfuro en las proteínas localizadas en retículo endoplasmático
Selenoproteína N	SelN	Membrana ER	Regulación de la movilización intracelular de calcio
Selenoproteína P	SelP	Plasma	Antioxidante, transporte y reserva de Se
Selenoproteína R	SelR	Citosol	Participa en el metabolismo de la metionina y en la reparación de proteínas
Selenoproteína S	SelS	Membrana ER	Degradación e proteínas mal plegadas
Selenoproteína T	SelT	ER y Golgi	Regulación de la función de las células-β pancreáticas y de la homeostasis de la glucosa
Selenoproteína W	SelW	Citosol	Posible función redox y antioxidante involucrado en metabolismo cardíaco

(ER: retículo endoplasmático; Mem.Plasm.: membrana plasmática)

1.1.2.2. Deficiencia y toxicidad del selenio

El selenio es necesario en los seres humanos en pequeñas cantidades, menores de 100 µg/día. Sin embargo las diferencias entre su deficiencia, ingesta apropiada y toxicidad son muy leves (Navarro-Alarcón and Cabrera-Vique, 2008; Bodnar *et al.*, 2012). La evolución desde la deficiencia severa hasta sus exposiciones más tóxicas pasa por varias etapas

(Alarcón, 2009), presentando un rango óptimo de ingesta dentro del cual los mecanismos homeostáticos son capaces de mantener óptimas sus concentraciones tisulares y las funciones normales (estado fisiológico óptimo). Por lo tanto, debe encontrarse un rango de ingesta óptimo para los oligoelementos esenciales. Los límites de este rango serán el nivel máximo de ingesta tolerable, UL (*Upper Level of Tolerable Intake*), que implica una tolerancia fisiológica y estima la cantidad máxima de un nutriente que se puede consumir de forma continua e inocua sin que conlleve ningún riesgo apreciable de efectos adversos para la salud (SCF, 2000a), y la ración dietética recomendada, RDA (*Recommended Dietary Allowance*), que determina la cantidad media necesaria y compatible con las funciones normales del organismo (protege al 95-98% de la población de efectos adversos de su deficiencia) (Aggett *et al.*, 2015).

Actualmente la ingesta diaria óptima de selenio para adultos varía en función del país u organismo internacional. Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición es 55 y 70 $\mu\text{g Se/día}$ para mujeres y hombres, respectivamente (AESAN, 2011). Para los organismos internacionales, European Food Safety Authority (EFSA) y Institute of Medicine (IOM) los valores son 70 y 55 $\mu\text{g de Se/día}$, respectivamente y para ambos sexos (IOM, 2000; EFSA, 2014), siendo para la OMS, 26 y 34 $\mu\text{g Se/día}$ para mujeres y hombres, respectivamente (WHO/FAO, 2004). El valor del nivel máximo de ingesta tolerable (UL) es de 300 $\mu\text{g de Se/día}$ para España y Europa y 400 $\mu\text{g Se/día}$ para EE.UU. Según la OMS, cubriendo estos valores de UL, la ingesta de selenio de todas las fuentes de alimento, incluyendo los suplementos, y tomando como referencia de toxicidad, es de 850 $\mu\text{g/día}$, que es el umbral en el que se han observado alteraciones bioquímicas en el metabolismo de selenio en los seres humanos (Aggett *et al.*, 2015).

Estas recomendaciones no consideran la especiación química del elemento, aunque un informe de la Junta de Alimentación y Nutrición de los Estados Unidos sugiere que puede ser absorbida más del 90% de la selenometionina (SeMet), mientras que aproximadamente el 100% de selenato es absorbido, aunque una fracción significativa se pierde en la orina. Más del 50% del selenito se absorbe y, además, se almacena mejor que el selenato (Bryszewska, 2015).

➤ *Deficiencia*

El importante papel de las selenoproteínas en el metabolismo justifica las consecuencias adversas de la deficiencia de selenio en la salud humana y animal, ya que se disminuye la expresión de las selenoproteínas, limitando la expresión de una o varias Se-enzima, alterando así los procesos biológicos mediados por ellas (Pedrero y Madrid, 2009). Los síntomas de deficiencia encontrados en seres humanos y animales son principalmente desórdenes relacionados con el músculo cardíaco y las articulaciones (Kieliszek y Błazejak, 2016).

El aporte de selenio al organismo se realiza principalmente a través de la dieta, constituyendo los alimentos la principal fuente de selenio de la población en general, ya que la ingesta desde el agua no contribuye significativamente; esta puede contener selenio, principalmente como selenato, aunque su contenido es normalmente bajo (WHO, 2011). Los alimentos presentan gran variación en el contenido de Se según su procedencia, ya que las plantas comestibles dependen del contenido y disponibilidad de Se en el suelo donde se cultivan, así como de su capacidad para incorporarlo, y los animales domésticos dependen de su propia dieta (Mehdi *et al.*, 2013). Las deficiencias de selenio se han estudiado en seres humanos y animales que habitaban regiones geográficas donde los suelos se caracterizan por su bajo contenido en selenio, observándose enfermedades asociadas a estados carenciales de este elemento, dándose los casos más graves y endémicos en China y Siberia Oriental (Pedrero y Madrid, 2009). Por lo tanto es evidente que la concentración de selenio en los suelos es crucial para una correcta ingestión de este elemento esencial.

Se han identificado enfermedades carenciales en el ganado, a gran escala, en diversos países con suelos deficientes en selenio, como la enfermedad del músculo blanco (miopatía del corazón y del músculo esquelético), los trastornos reproductivos (afecta a espermatozoides y embriones), la depresión de crecimiento (afecta a la masa muscular) o la diátesis exudativa (lesiones en las paredes de los capilares). En regiones con poco selenio, los productores han adoptado medidas para asegurar que sus animales obtengan las cantidades adecuadas de selenio (fertilización de suelos con selenio y alimentos Se-enriquecidos) (Suttle, 2010).

La consecuencia más grave de la deficiencia de selenio en humanos se asocia a dos enfermedades endémicas: la enfermedad de Keshan, miocardiopatía endémica que ocurre,

principalmente en niños y mujeres jóvenes, de grupos de población con ingestas de selenio baja (7-11 $\mu\text{g Se/día}$); y la enfermedad de Kaschin-Beck, una osteoartritis degenerativa crónica que acontece en la infancia y la pubertad, que también ocurre en regiones donde la disponibilidad de Se en el suelo para el crecimiento de los cultivos es baja, como zonas rurales de China y Siberia Oriental y, también, parece estar relacionada con una forma de cretinismo asociada con el hipotiroidismo; aunque se cree que las tres enfermedades tienen otros cofactores causantes (Rayman, 2000; Pedrero y Madrid, 2009).

Las deficiencias moderadas de este micronutriente también pueden tener un impacto negativo en la salud humana, ya que se han asociado con el funcionamiento deficiente de una serie de procesos y sistemas en los que está involucrado el Se como: sistema inmune (producción de linfocitos T); la virulencia y progresión de diversas infecciones virales (poliovirus, virus de la gripe, hepatitis B y C, VIH); la fertilidad masculina (movilidad del esperma y síntesis de testosterona); la regulación del estado anímico y de algunos neurotransmisores cerebrales (depresión, ansiedad, confusión mental y hostilidad, ataques epilépticos, Alzheimer); la función tiroidea (actividad deiodinasa que promueve la conversión de la hormona tiroidea T4 a su forma activa T3); y las reacciones antioxidantes y antiinflamatorias (Rayman, 2000; 2012).

Actualmente estas deficiencias, aunque se deben principalmente a un insuficiente aporte de este micronutriente en la dieta, también están vinculadas a los gustos nutricionales especiales de algunos grupos sociales y a los cambios en los hábitos alimenticios (Mistry *et al.*, 2012; Kieliszek y Błazejak, 2016). Estas deficiencias, como consecuencia de una ingesta inadecuada, son evidentes en los estados nutricionales alterados por una enfermedad, como es el caso de los pacientes que reciben nutrición enteral (alimentación por sonda) o nutrición parenteral total (alimentación intravenosa) (Pedrero y Madrid, 2009). Además, la deficiencia puede darse en individuos bien nutridos, sin presentar síntomas evidentes, pero con predisposición al desarrollo de ciertas enfermedades (por ejemplo, infecciones), ya que experimentan un estrés adicional (IOM, 2006).

➤ **Toxicidad**

La toxicidad del Se depende de factores como su forma química, especie biológica, naturaleza del compuesto (particularmente su solubilidad) y, concentración, así como la

edad y sexo de los organismos, y la vía de absorción del compuesto. La toxicidad del selenio es acumulativa (EVM, 2003).

A escala global, la toxicidad por selenio en seres humanos está mucho menos generalizada que la deficiencia de Se, siendo la dosis máxima tolerable de Se (UL) de 300 µg Se/día para adultos en España y Europa (EFSA, 2006; AESAN, 2011).

El exceso crónico de selenio (>1000 µg Se/día) puede dar lugar a la selenosis, cuyos síntomas más característicos son dolor de cabeza, cabello quebradizo, deformación y pérdida de uñas, erupción cutánea, olor a ajo del aliento y la piel, un exceso de caries dentales, así como vómitos y edema pulmonar en intoxicaciones más agudas. Los niveles de exposición en la dieta en los que el selenio se convierte en tóxico y se desarrolla la selenosis son difíciles de establecer, debido a que la toxicidad se ve afectada por la forma en la que el selenio está disponible en el alimento y, posiblemente también, por la combinación con otros componentes de la dieta e interacciones con el genotipo (Fairweather-Tait *et al.*, 2011). Los datos disponibles sugieren que las toxicidades crónicas de las formas inorgánicas y orgánicas de selenio tienen características clínicas similares, pero difieren en la rapidez de inicio y en la relación con la concentración de selenio en los tejidos. El Se inorgánico puede causar toxicidad en los tejidos a niveles mucho más bajos que los observados con ingestas similares en la dieta de Se como selenometionina (IOM, 2006).

En animales, se puede dar dos tipos de intoxicación: aguda, producida habitualmente por el consumo de plantas acumuladoras de selenio (seleníferas) presentando trastornos motrices, diarrea oscura, hipertermia, pulso débil y rápido, respiración dificultosa, dolor abdominal, meteorismo, depresión y mucosas pálidas; crónica (Enfermedad del álcali), que ocurre cuando los animales consumen cantidades de 5 a 25 mg Se/kg durante mucho tiempo, presentando parálisis de la lengua, respiración laboriosa y rápida, exceso de saliva, hipotermia, anemia, alopecia y deformación de estructuras córneas, siendo los principales signos de toxicidad los trastornos musculo-esqueléticos tales como la marcha rígida y la cojera (Alexander, 2015).

➤ **Beneficios del selenio en la salud humana**

En los seres humanos se ha constatado que el selenio presenta efectos positivos para la salud como son (López-Bellido y López, 2013):

- Favorece un adecuado funcionamiento del sistema inmune (la producción de linfocitos T y la actividad de las células Naturalkiller) (Wood *et al.*, 2000).

- Reduce la virulencia y progresión de infecciones virales (virus de Koxsackie, poliovirus, hepatitis B y C, el virus de la gripe y VIH) (Rayman, 2000).

- Es esencial para la fertilidad masculina (mayor movilidad del espermatozoides y síntesis de testosterona) (Rayman, 2012) y posiblemente femenina (reducción del riesgo de aborto) (Barrington *et al.*, 1997).

- Regula el estado anímico y de algunos neurotransmisores en el cerebro (reduce la incidencia de depresión, ansiedad, confusión mental y hostilidad, ataques epilépticos y Alzheimer) (Rayman, 2000; 2012).

- Favorece la función tiroidea (producción y regulación de la actividad de la tiroides que promueve la conversión de la hormona tiroidea T4 a su forma activa T3) (Fan *et al.*, 2014).

- Actúa como agente antioxidante y antiinflamatorio (efectos beneficiosos contra la artritis reumatoide, pancreatitis y asma) (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique, 2008).

- Posee actividad antitumoral, con efectos anticancerígenos al menos en determinadas condiciones, sobre cánceres de hígado (HCC), colon, recto, páncreas, mama, ovarios, próstata, vejiga, pulmón y piel (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique, 2008) y en células de leucemia mieloide y linfoblástica aguda humana, así como en células de hepatoma, melanoma y mesotelioma (Fernandes y Gandin, 2015).

1.1.3. DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA DEL SELENIO EN EL MEDIO NATURAL

El selenio en el medio se encuentra tanto en forma inorgánica como orgánica. La abundancia relativa de los distintos compuestos depende de las contribuciones relativas de las fuentes naturales y antropogénicas del selenio al medio, distribuyéndose por los distintos compartimentos medioambientales (aire, agua, suelo y biota) en diferentes formas químicas y niveles de concentración, dependiendo de factores como pH, solubilidad, potencial redox, presencia de determinados minerales y actividad biológica.

1.1.3.1. Aire

En el aire el Se puede presentarse en forma gaseosa, pero principalmente se encuentra como partículas en suspensión (selenio elemental (Se^0), dióxido de selenio (SeO_2)), no estando habitualmente disponible como fuente de Se para plantas y animales en su forma particulada. Otras formas de Se en el aire, dimetilselenio y dimetildiselenio, proceden de procesos de su biometilación producidos por la actividad microbiana presente en el suelo, por algunas plantas y, a veces, en el aire expirado por los animales (ATSDR, 2003). La distribución del Se atmosférico es altamente heterogénea sobre la superficie de la Tierra, siendo su concentración media generalmente baja (de 1 a 10 ng m^{-3}) (Wen y Carignan 2007; Mehdi *et al.*, 2013), aunque en algunas zonas industriales se pueden alcanzar valores muy superiores, como los 42.3 ng m^{-3} detectados en una área del Reino Unido (Lee *et al.*, 1994)

1.1.3.2. Agua

Las principales especies de selenio que encontramos disueltas en aguas naturales oxigenadas son selenato (SeO_4^{2-}) y selenito (SeO_3^{2-}), así como selenuros (-2) orgánicos disueltos formados a partir de la materia orgánica particulada fina. Las especies particuladas en la columna de agua incluyen selenato, selenito y selenio elemental ($\text{Se}(0)$) unidas a sedimentos resuspendidos y partículas orgánicas, así como especies de selenio orgánico incorporadas en partículas de detritus suspendidos (USEPA, 2016).

El selenato (SeO_4^{2-}) suele predominar en aguas bien oxigenadas, especialmente en aquellas con condiciones alcalinas, y es uno de los compuestos de selenio más móviles en el medio ambiente, potenciada por su pobre adsorción a las partículas del suelo (Figura 1.1). Las especies del ácido selenoso (HSeO_3^- o SeO_3^{2-}) pueden predominar en disolución cuando las condiciones del agua son moderadamente oxidantes. Además, debido a que el ácido selenioso es un ácido débil, es fácilmente adsorbido por los sólidos en suspensión. El ión biselenito predomina en aguas con un pH entre 3,5 y 9,0 y, a valores de pH inferiores a 7,0, los selenitos se reducen rápidamente a selenio elemental bajo condiciones ligeramente reductoras, situaciones que son comunes en los sedimentos del fondo (Barceloux y Barceloux, 1999; Mehdi *et al.*, 2013; USEPA, 2016). Por lo tanto, en comparación con el selenato, el selenito es más reactivo debido a su carácter polar, su basicidad (atracción a

enlazar con el protón) y su nucleofilia (atracción a enlazar con un núcleo usando los dos electrones del ión) (Frankenberger y Engberg, 1998; USEPA, 2016).

Los selenuros orgánicos, Se(-2), también están presentes en el agua, en concentraciones variables, generalmente en forma libres y combinadas de selenometionina y selenocisteína (Fisher y Reinfelder 1991). Estos selenuros orgánicos disueltos son una fuente importante de selenio para la biota, ya que pueden representar un porcentaje elevado del selenio disuelto en las aguas superficiales en mar abierto y una fracción importante en muchos otros ambientes (Cutter, 1989; Cutter y Cutter, 1995).

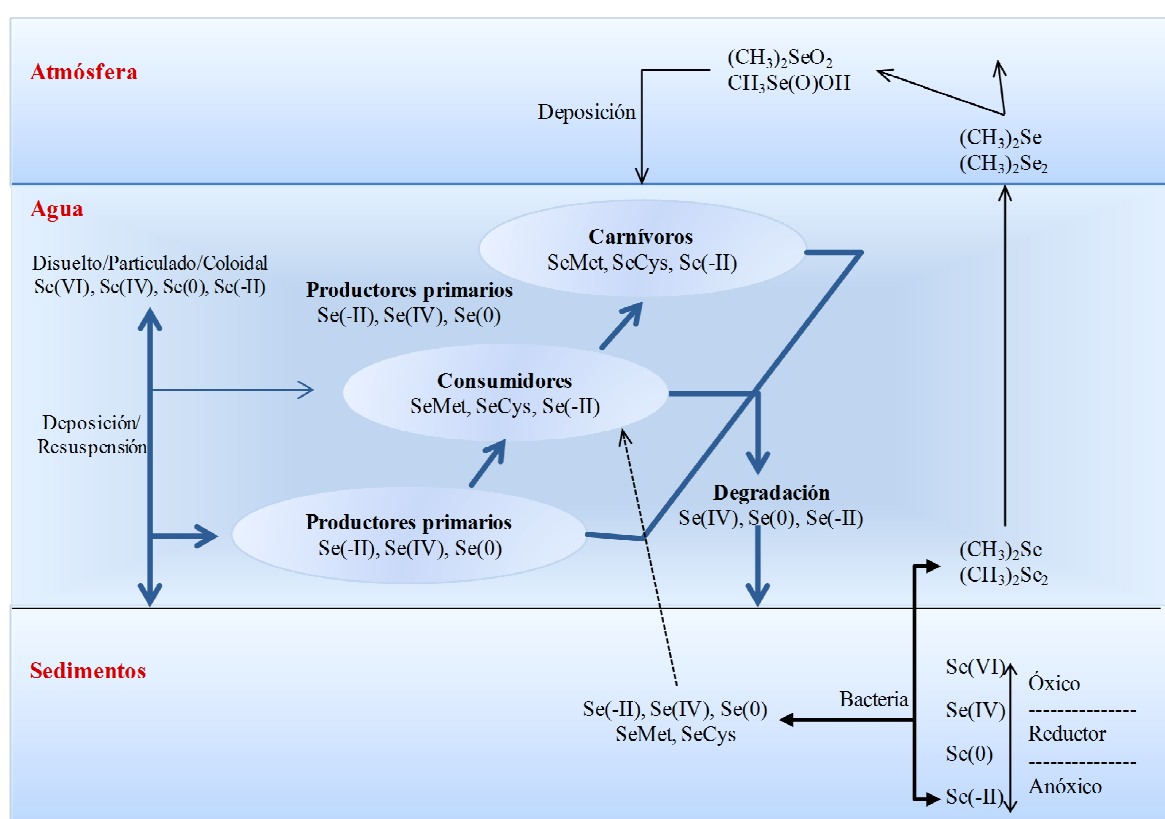


Figura 1.1. Especies de selenio asociadas con los principales procesos en sistemas acuáticos (Chapman *et al.*, 2009)

La concentración de selenio en aguas subterráneas y superficiales puede variar ampliamente ($0,06\text{--}400 \mu\text{g Se L}^{-1}$), pero habitualmente no excede de $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$. Las altas concentraciones son debidas a la presencia de fuentes naturales o antropogénicas. En estas últimas, en la mayoría de los casos se debe a la suplementación de las tierras agrícolas con fertilizantes que contienen Se. La concentración en agua de mar es generalmente baja, de $0,04$ a $0,12 \mu\text{g Se L}^{-1}$ (Barceloux y Barceloux, 1999; Mehdi *et al.*, 2013).

Las diferentes instituciones y países han adoptado distintas directrices para establecer el límite superior de Se en el agua potable siendo de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para la Agencia de Protección Medioambiental de EEUU (USEPA, 2017) y $40 \mu\text{g L}^{-1}$ para la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Unión Europea (WHO, 2011; DOUE, 2015).

1.1.3.3. Suelos y sedimentos

El selenio se encuentra ampliamente distribuido por toda la corteza terrestre con una concentración muy baja ($0,05\text{-}0,09 \text{ mg Kg}^{-1}$). El factor primario que controla las concentraciones de selenio en el suelo es el contenido de selenio de esos materiales de la roca madre, ya que lo liberan al suelo y a las aguas subterráneas y superficiales a través de procesos de erosión y lixiviación. En términos globales, el Se tiende a concentrarse más en las rocas sedimentarias que en las ígneas (Mayland *et al.*, 1989; ATSDR, 2003).

El Se total en el suelo suele ser bajo de $0,01$ a 2 mg Kg^{-1} (media mundial: $0,4 \text{ mg Kg}^{-1}$), aunque algunas áreas de China, la India y los EE.UU. tienen niveles muy altos, con un contenido total que puede exceder 1 g Kg^{-1} , los llamados suelos seleníferos (Christophersen *et al.*, 2013). Las bajas concentraciones son comunes en suelos ácidos altamente degradados, derivados de rocas ígneas como el granito, así como en zonas de alta precipitación, donde la lixiviación de los suelos aeróbicos es considerable (Fishbein, 1983; Schulin *et al.*, 2010). Generalmente el selenio tiende a concentrarse en los suelos de las regiones más secas del mundo (Mehdi *et al.*, 2013).

El Se disponible en el suelo no tiene una buena correlación con la cantidad de Se total en el suelo, y es además muy variable, tanto a nivel local como global. Además, su movilidad y biodisponibilidad están interrelacionadas, pero no necesariamente son sinónimos (Winkel *et al.*, 2015). La presencia y las formas de Se en los suelos, así como su biodisponibilidad, están condicionados por las características biogeoquímicas del suelo: contenido de arcilla, agua y materia orgánica, vegetación asociada, cantidad de componentes de la sorción (óxido/hidróxidos de hierro y aluminio), pH y condiciones redox (CCME, 2009); Paikaray, 2016). Además, la presencia de aniones (sulfato, fosfato y aniones orgánicos) compitiendo por las mismas superficies de sorción afecta a la absorción y la retención de Se en el suelo y, asimismo, la actividad microbiana es importante para las interacciones del Se con la materia orgánica (Mayland *et al.*, 1991).

Las principales especies son el selenio elemental, selenitos (como ácido selenioso, H_2SeO_3), selenatos (como ácido selénico, H_2SeO_4), selenio (-2) y selenio asociado con constituyentes orgánicos; en la disolución del suelo, el selenio se encuentra generalmente como selenato (SeO_4^{2-}) o ácido selenoso (HSeO_4^-) (forma protonada) (Kuisi y Abdel-Fattah, 2010).

El selenio elemental se forma en suelos húmedos y anóxicos (Tayfur *et al.*, 2010) y los selenuros y selenitos se encuentran, como compuestos insolubles, en suelos ácidos y con altas cantidades de materia orgánica (Harada y Takahashi, 2009). El selenio elemental y los selenuros se pueden convertir en selenatos en condiciones oxidantes, y estos pueden reducirse a selenuros de hierro o selenio elemental bajo procesos abióticos o bióticos, por ejemplo, el selenato puede reducirse a selenio elemental en presencia de óxidos de hierro (Chen *et al.*, 2008) y sulfuros de hierro (Breynaert *et al.*, 2008).

Aunque el Se en suelo y sedimento se encuentra principalmente en forma inorgánica, también puede estar presente en formas orgánicas, por ejemplo, en complejos con materia orgánica o incorporado en coloides orgánicos u órgano-minerales. Así como en formas orgánicas volátiles de Se, tales como dimetilselenio (DMSe) y dimetildiselenio (DMDS) (Winkel *et al.*, 2015). Los organismos del sedimento, los microorganismos y los exudados de la rizosfera de las plantas pueden aumentar la formación de especies reducidas de Se orgánico en los suelos, ya que pueden reducir el selenato y el selenito a selenocompuestos orgánicos y selenio elemental (Maher *et al.*, 2010). En general, la reducción del selenato y, particularmente, del selenito se incrementa en los sedimentos con el aumento de la materia orgánica (Tokunaga *et al.*, 1997). El selenito se une fácilmente a los oxihidróxidos de hierro y manganeso, y se adsorbe fácilmente a partículas inorgánicas y orgánicas, sobre todo a un rango de pH más bajo. La reducción microbiana de selenito a formas orgánicas (vía metilación) aumenta la solubilidad y biodisponibilidad de selenio (Simmons y Wallschlägel, 2005; USEPA, 2016).

1.1.3.4. Biota

La ruta de entrada de selenio en los organismos se realiza mediante la absorción directa (desde el agua o el aire) o a través de la cadena trófica, aunque la principal es esta última,

produciéndose la entrada de Se desde la base de las cadenas alimenticias (productores primarios).

En general, el selenio es incorporado desde la fracción disuelta por algas y microorganismos, siendo su absorción mayor en los ambientes dominados por el selenito y los organoselenuros que por el selenato. Estos organismos transforman los selenitos y selenatos disueltos en compuestos orgánicos (selenocisteína, selenometionina, dimetilselenio, dimetildiselenio) en sus células, que se transfieren a través de la cadena trófica, siendo a menudo biomagnificados en invertebrados de niveles tróficos superiores (Barceloux y Barceloux, 1999; Lee *et al.*, 2006). Las vías de transporte de los elementos traza a través de la membrana biológica han sido postuladas como la difusión pasiva de especies neutras del metal a través de la membrana, la difusión facilitada de metales a través de proteínas transportadoras de membrana, el acceso a través de canales iónicos principales (por ejemplo, canales de calcio) quizá en asociación con bombas de iones activas, y la endocitosis (Simkiss y Taylor, 1995).

En las plantas superiores, aunque no parecen requerir selenio, su incorporación ocurre principalmente en las raíces, siendo el selenato la especie disuelta con mayor absorción. Tras la absorción, el Se metaboliza en especies orgánicas que se asimilan en los tejidos: el selenato se reduce a selenito y, posteriormente, a selenuro, el cual se incorpora en los aminoácidos para formar Se-metilselenocisteína, SeMet y SeCys, y aunque pueden formarse otras especies orgánicas, estas últimas reemplazan a la cisteína y metionina en las proteínas (Dumont *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2009). Así, el selenio ingresará en la cadena alimenticia a través de las proteínas vegetales. Cuando los niveles de Se en el medio son normales entrará principalmente como Se-Met o SeCys (esta última en menor proporción), pero cuando los niveles de Se en el medio son elevados, la Se-Met la pueden metabolizar adicionalmente a Se-adenosil-Se-Met y Se-MetSeMet, que a su vez se convierte en Se-MeSeCys y γ -glu-SeMetSeCys, que previenen de los posibles daños causados por la SeMet o SeCys, por lo tanto, en este caso, la Se-MetSeCys se convierte en el compuesto de Se predominante, aunque algunos otros compuestos también podrían estar presentes, a niveles mucho más bajos (Mayland *et al.*, 1989; Dumont *et al.*, 2006). La absorción de Se, aunque habitualmente es baja, varía ampliamente entre las plantas, más que la mayoría de los elementos traza. Algunas pueden acumular altos contenidos de Se, las denominadas plantas acumuladoras seleníferas (Moreno *et al.*, 1998). Además, las plantas y algas pueden

producir especies volátiles de selenio (DM-Se, DMD-Se y dietilselenio (DE-Se)) por biometilación del exceso de selenio, observándose una amplia variación en estas especies volatilizadas en función de la especie vegetal (Díaz *et al.*, 2009).

Posteriormente, las especies de selenio orgánicas se transfieren a través de la cadena trófica, desde estos productores primarios (microorganismos, algas y plantas) a organismos de niveles superiores, bioacumulándose así en los consumidores primarios y secundarios (invertebrados y vertebrados) (Chapman *et al.*, 2009; Luoma y Presser, 2009). Por lo tanto, la bioacumulación de selenio en los animales dependerá de la dieta (elección del alimento) y de los procesos fisiológicos del organismo como la eficiencia de absorción o a la tasa de eliminación de Se, ya que pueden ser diferentes entre los distintos grupos taxonómicos. En el caso de los mamíferos, metabolizan los compuestos ingeridos en múltiples especies de selenio, incluyendo el selenuro de hidrógeno (H_2Se), que constituye la base para la biosíntesis de las selenoproteínas esenciales (Gammelgaard *et al.*, 2011), y compuestos organoselénicos, como metilselenol o trimetilselenonio (Figura 1.2) En general, el selenio se encuentra principalmente en forma de selenometionina o selenocisteína en sus tejidos (IOM, 2006).

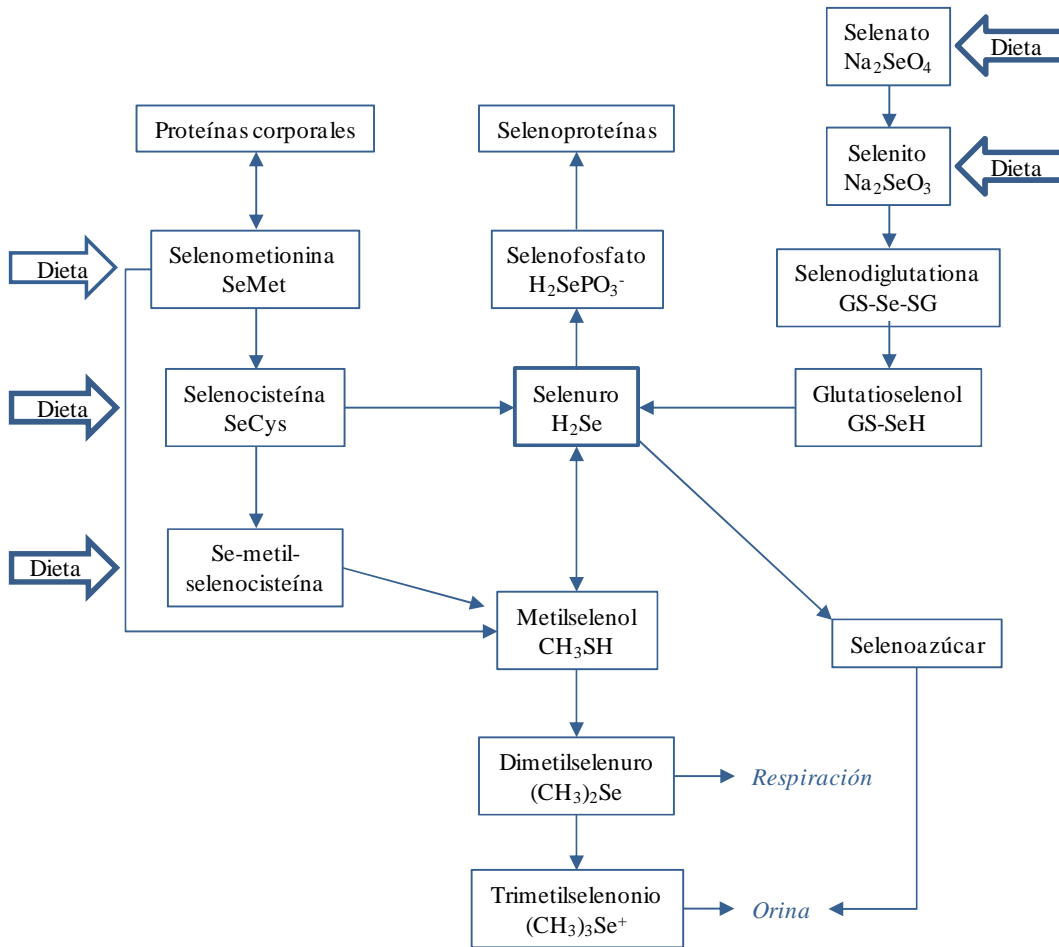


Figura 1.2 Esquema de la ruta metabólica del Se con las principales vías del Se dietético en mamíferos (Wrobel *et al.*, 2016)

En la mayoría de los ecosistemas, las concentraciones de selenio generalmente se conservan o aumentan gradualmente en cada nivel trófico de una cadena alimenticia, después de un aumento sustancial en el primer nivel trófico a partir del selenio disuelto, ya que los productores primarios generalmente concentran Se de 10^2 a 10^6 veces por encima de las concentraciones disueltas ambientales (Chapman *et al.*, 2009). Además, la eliminación relativamente rápida del selenio de los organismos y la variación del selenio en las dietas de los consumidores limitan la biomagnificación del selenio en la parte más alta de la cadena alimentaria. El nivel de bioacumulación del Se suele ser más bajo, en comparación con otros elementos químicos bioacumulativos, como el mercurio, cuya biomagnificación es mucho mayor (USEPA, 2016).

1.1.3.5. Organismos marinos

Respecto a los organismos marinos, en general, estos poseen mayores concentraciones de selenio que los organismos de agua dulce, sin aparentes efectos adversos, siendo la alta absorción de Se por los productores primarios y la alta eficiencia de asimilación o las tasas de alimentación las que explican estas mayores concentraciones de Se en especies marinas, aunque no aclaran los mecanismos exactos que mitigan la toxicidad (Janz *et al.*, 2010).

En el caso de los moluscos bivalvos, ingieren fitoplancton y material particulado que contienen Se y, además, pueden absorber directamente Se disuelto en el medio, aumentando la concentración en sus tejidos, acumulando más Se que otros organismos de su mismo nivel trófico (como crustáceos planctónicos e insectos) debido a una mayor tasa de ingestión, como organismos filtradores, y a una menor tasa de eliminación de selenio (8-10 veces más lenta que crustáceos) (Stewart *et al.*, 2004). Las razones de estas diferencias en la pérdida no se conocen bien, pero parecen estar relacionadas con la eficiencia con la que los organismos reciclan proteínas que contienen Se (Wright y Manahan, 1989; Manahan, 1990; Wright, 1995).

Además, los efectos debidos al selenio se presentan en los invertebrados a concentraciones más altas que en los vertebrados (por ejemplo en peces) (Luoma y Rainbow, 2005; Stewart *et al.*, 2013). Esto es debido, probablemente, a su capacidad para regular las concentraciones de cationes de metales pesados dentro de la célula y acumular el exceso de metal en formas no tóxicas (Viarengo, 1989; Rainbow, 2002). Esta bioacumulación por los invertebrados de nivel trófico inferior (como zooplancton y bivalvos), les convierte en los animales que proporcionan el vector (alimento), que es la fuente de exposición al selenio para los depredadores del nivel trófico superior (como peces o aves) (Presser y Luoma, 2006).

Debido a todas estas cualidades, los bivalvos son utilizados habitualmente como bioindicadores de la contaminación acuática, ya que bioconcentran y bioacumulan contaminantes, como los metales traza, en sus tejidos (Ismail, 2006; Zhou *et al.*, 2008). En este sentido se entiende por bioconcentración el aumento de concentración de una sustancia en el organismo (o tejido específico) en relación con la concentración de la sustancia a la que está expuesto en el medio (generalmente agua), y por bioacumulación la

cantidad de una sustancia absorbida por un organismo a partir de agua (bioconcentración), así como por la ingestión a través de la dieta y/o la inhalación (MERAG, 2007). Además, cuando los niveles de un tóxico aumentan, los moluscos bivalvos muestran respuestas indicativas de estrés, que pueden medirse y relacionarse directamente con la naturaleza y la cantidad de tóxico presente en el medio, estas respuestas consisten en alguna manifestación fisiológica, bioquímica o de comportamiento que puede ser medible a nivel celular, del tejido o del organismo (Chandurvelan *et al.*, 2012).

Al mismo tiempo que la capacidad de bioconcentración y bioacumulación, se debe tener en cuenta que una vez absorbido el selenio, puede realizarse la biotransformación del elemento, de modo que cambia su forma química. Esta biotransformación puede alterar sus efectos biológicos, dando lugar a la formación de especies más o menos tóxicas o beneficiosas. El conocimiento de esta especiación química es esencial para predecir sus propiedades como estabilidad, movilidad, toxicidad y biodisponibilidad potencial para el organismo, ya que su actividad biológica se ha demostrado que depende de su especiación (Weekley and Harris, 2013). Igualmente, según la naturaleza de la especie química existirán diferentes vías de eliminación (desintoxicación).

La acumulación y metabolismo también estarán condicionados, entre otros factores, por la forma química en que esté presente el mineral en el alimento y en el medio y, además, se debe tener en cuenta, que no todos los moluscos bivalvos tienen las mismas capacidades para acumular o metabolizar los minerales presentes, mostrando una amplia gama de variaciones en las concentraciones de Se, incluso coexistiendo en el mismo sitio (Lee *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios realizados en moluscos bivalvos se han desarrollado para evaluar la bioacumulación de contaminantes acuáticos empleándolos como especies bioindicadoras (Wang *et al.*, 1996), los grupos de bivalvos más utilizados habitualmente son los mejillones (por ejemplo *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californicus*), ostras (por ejemplo *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*) y almejas (por ejemplo *Mercenaria mercenaria*, *Venerupis sp.*, *Macoma balthica*) (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2002). Las evaluaciones se realizan por medio de modelos cinéticos que requieren información sobre las eficiencias de absorción desde las vías del alimento y del agua (asimilación fisiológica y eficiencia de absorción), las tasas de eliminación de

contaminantes desde los organismos, y las tasas de filtración, de ingestión y, en ocasiones, de crecimiento, y pueden ser analizados para niveles de concentración del tóxico en el organismo o en tejidos bajo cualquier conjunto de condiciones ambientales (Roditi y Fisher, 1999).

La asimilación de Se a partir de la dieta (microalgas) se han estudiado en diversas especies bioindicadoras, como el mejillón azul (*Mytilus edulis*), la macoma báltica (*Limecola balthica*), la almeja americana (*Mercenaria mercenaria*) y la ostra americana (*Crassostrea virginica*), entre otras, desarrollándose modelos biodinámicos y resultando la asimilación, generalmente, un proceso eficiente al 70- 90% (Zhang *et al.*, 1990; Luoma *et al.*, 1992; Reinfelder y Fisher, 1994; Wang and Fisher, 1996, 1997; Reinfelder *et al.*, 1997; Roditi and Fisher, 1999; Ke and Wang, 2001). Se ha constatado la influencia de la salinidad y la temperatura sobre la bioacumulación (Lee, 2006) y, también que algunos bivalvos ingieren selectivamente microalgas a partir de partículas en suspensión, y otros que no exhiben esta alimentación selectiva, lo que puede dar lugar a patrones de acumulación de Se diferentes entre los bivalvos (Schlekat *et al.*, 2002).

Destaca la diferencia entre especies similares en cuanto a los mecanismos de bioacumulación para lograr una alta concentración de metales, así Ke y Wang (2001), al realizar un modelo cinético para predecir las vías de exposición (fases acuosa, dietética y sedimento) en dos especies de ostras (*Crassostrea rivularis*, ostra de Suminoe, y *Saccostrea glomerata*, ostra australiana), observaron que en ambas dominó la exposición a través de la dieta alcanzando una alta concentración de Se, pero varió el mecanismo de bioacumulación, debido a altas tasas de ingestión, de concentración de metales en el seston y de absorción desde la fase acuosa (relacionada con la alta tasa de clarificación (Wang, 2001)), o a una lenta tasa de eliminación en los tejidos.

Fournier *et al.* (2005a; 2005b; 2006) realizaron un amplio estudio sobre la bioacumulación y el efecto del Se en la actividad ventilatoria de la almeja asiática dulceacuícola *Corbicula fluminea*, a partir de selenio disuelto (selenito, selenato o selenometionina), y de microalgas, tanto sin Se como selenizadas (pre-expuestas a las tres especies de Se). La actividad ventilatoria dependió estrechamente de la especiación: SeMet inhibe, selenito estimula y selenato no influye. SeMet disuelta fue la especie más bioacumulada a nivel de órganos, seguida de selenato y selenito, respectivamente. A pesar de que los bivalvos

mostraron diferentes comportamientos ventilatorios según las densidades de algas (sin Se) utilizadas, no hubo evidencia de reducción en la acumulación de Se disuelto; en cambio, se observó la existencia de una relación entre el total de alga selenizada que pasa a través de las branquias y las tasas de bioacumulación. Estos autores demostraron que la bioacumulación de Se en almejas, en sus condiciones experimentales, era proporcional a la masa total de Se ingerida. Es decir, la bioacumulación depende de la cantidad de Se bioacumulado en las algas, lo cual depende claramente de la especiación en el medio de exposición y de la tasa de ventilación del animal, que a su vez depende claramente de la densidad de las algas.

En este sentido, Adam-Guillermin *et al.* (2009) examinaron los patrones de bioacumulación y toxicidad del Se en *C. fluminea* expuesta a selenio orgánico disuelto, selenometionina, con el fin de reproducir una transferencia trófica de algas. Los resultados fueron coincidentes con este tipo de estudios y, además, una mayor tasa de absorción que de depuración sugirió que el bivalvo hace frente a altas cantidades de Se utilizando una estrategia de detoxificación basada en el secuestro de Se, que podría implicar a gránulos celulares, ya que hubo un fuerte aumento de Se en la fracción subcelular particulada. El selenio persiste en proteínas del citosol, reemplazando a la metionina, y posiblemente, una alteración posterior de la función de la proteína podría ser uno de los mecanismos de toxicidad del Se, que podría explicar los efectos histopatológicos observados en las branquias.

En la literatura también se describen exposiciones de bivalvos a sedimentos contaminados con selenio, como la tellina australiana (*Tellina deltoidalis*) a exposiciones de 5 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se, que demostraron que el selenio podía ser acumulado presentando una clara relación exposición-dosis-respuesta y, su distribución subcelular mostró un aumento del porcentaje de selenio en la fracción biológicamente detoxificada de organismos expuestos al selenio y se asoció con los gránulos y las proteínas similares a la metalotioneína (probablemente el Se asociado con el azufre, como mecanismo para incorporarlo en gránulos). La exposición al Se condujo también a un deterioro de su sistema antioxidante (Taylor y Maher, 2014).

En el caso de la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), su capacidad de bioacumulación ha sido estudiada en relación a una serie de metales como son el Cd, Cu o Zn, realizándose estudios sobre su distribución en tejidos y a nivel subcelular (Roméo y Gnassia-Barelli,

1997), la evaluación de efectos tóxicos y bioacumulación del cadmio (Henry *et al.*, 1982; 1984; Figueira *et al.*, 2012), la respuesta del sistema antioxidante de las branquias a la exposición al cobre (Geret *et al.*, 2002), el efecto de la contaminación por cadmio sobre su reproducción (Smaoui-Damak *et al.*, 2006; Ketata *et al.*; 2007), los efectos de la exposición al cadmio, cobre y/o zinc sobre la inducción de metalotioneínas (Bebianno *et al.*, 1993; 1994; 2000; Bebianno y Serafim, 1998; 2003; Hamza-Chaffai *et al.*, 2000; Smaoui-Damak *et al.*, 2004; 2009; Serafim and Bebianno, 2010), los efectos del cadmio en los perfiles de expresión de proteínas en las branquias y la glándula digestiva (Chora *et al.*, 2009), y la acumulación de metales (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb o Zn) y/o su depuración como especie de consumo (Usero *et al.*, 1997; El Nemr *et al.*, 2012; Figueira y Freitas, 2013), así como de organismo bioindicador de contaminación (Bebianno *et al.*, 2004; Cravo *et al.*, 2012).

En almeja fina no se han realizado estudios toxicocinéticos de selenio, siendo necesarios para comprender los procesos dinámicos de absorción, distribución y eliminación; los mecanismos de toxicidad y tolerancia desarrollados por esta especie. Así mismo, es necesario estudiar su capacidad de biotransformación de los compuestos de selenio y sus especies químicas, ya que es un molusco que tiene una importancia económica relevante como recurso comercial para el consumo humano, tanto pesquero como acuícola, y con un alto valor nutricional (*Apartado 1.2.2*). Además, su suplementación con Se puede tener efectos positivos, ya que podría modificarse la concentración y/o la forma química del mineral en sus tejidos, resultando una fuente de selenio de especies químicas quizá con una biodisponibilidad y bioactividad diferentes y, por lo tanto, con beneficios para la salud.

1.1.4. ALIMENTOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO

Actualmente cada vez existen más evidencias de que la deficiencia subclínica de Se puede causar efectos adversos para la salud y, además, que sus niveles supra-nutricionales pueden proporcionar protección adicional contra diversas enfermedades (Figura 1.3). En base a estos efectos, la bajada o disminución de la ingesta y el estatus de Se en algunas partes del mundo, incluidos algunos países europeos, es una evidencia, como se puede apreciar en el trabajo realizado por Stoffaneller y Morse (2015) que, tras una amplia revisión de los datos existentes sobre grupos de población en Europa y Oriente Medio, han concluido que la ingesta y el estado de selenio (considerando $90 \mu\text{g Se L}^{-1}$ en plasma o suero la

concentración de selenio necesaria para optimizar la actividad GPx) son sub-óptimos en los países europeos y el Medio Oriente, coincidiendo sus resultados con otros trabajos en los que se destaca este problema (Combs *et al.*, 2001; Fernández-Bañares *et al.*, 2002; Rayman, 2008; Flynn *et al.*, 2009; Fairweather-Tait *et al.*, 2011; López-Bellido y López, 2013).

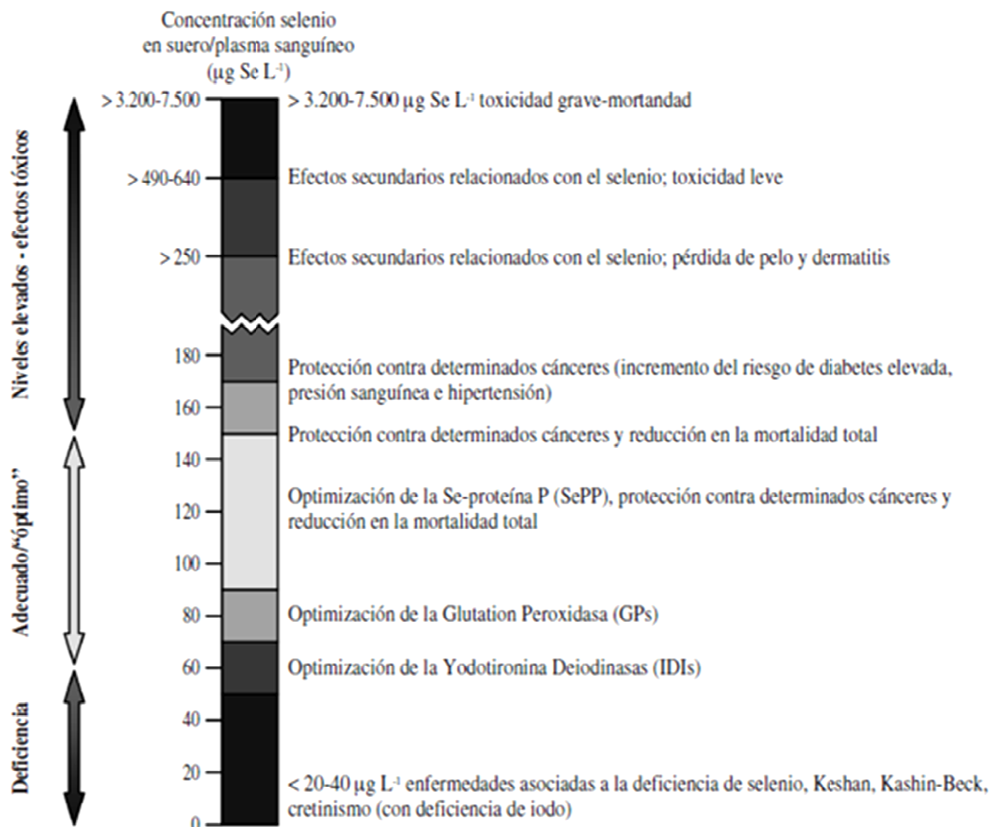


Figura 1.3. Diferentes rangos de concentraciones de selenio en sangre (suero/plasma), desde su deficiencia a su toxicidad, con los efectos asociados sobre el metabolismo y la salud humana (modificado de Fairweather-Tait *et al.* (2011 por López-Bellido y López (2013))

La industria alimenticia dirige parte de sus esfuerzos a encontrar nuevas metodologías para modificar o promover las propiedades naturales de los productos destinados a la alimentación humana. De esta forma surge el concepto “alimento funcional” que, por sus características beneficiosas para la salud humana, se convierte en una pieza importante de la ciencia de los alimentos, considerando alimento funcional a todo producto alimenticio, natural o procesado, el cual ha sido modificado por adición, remoción o cambio en la biodisponibilidad de algún componente, mediante herramientas tecnológicas o biotecnológicas, al que le han sido atribuidas propiedades benéficas para la salud más allá de los efectos generados por una nutrición adecuada, debido a que pueden favorecer

funciones fisiológicas, y los sistemas nervioso, inmune o cardiovascular, por ejemplo, o reducen el riesgo de adquirir ciertas enfermedades (Vinchira y Muñoz-Ramírez, 2010).

Las evidencias de escasez de selenio expuestas anteriormente, así como las propiedades del selenio a favor de la salud humana, han permitido que el Se sea incorporado y tenga un impacto importante en la industria alimenticia actual. De esta forma se han buscado alternativas para distribuir el mineral en la población, por ejemplo, los vegetales se han enriquecido de diferentes formas, tanto mediante procesos de biofortificación como por adición directa durante su procesado, como el enriquecimiento de selenio en trigo (Hart *et al.*, 2011) o en tomates (Aro *et al.*, 1995). También se han suplementado (en forma de selenito) las dietas de animales de consumo humano para enriquecer productos de origen animal como la leche (Juniper *et al.*, 2006), los huevos (Payne *et al.*, 2005) o la carne de cordero (Juniper *et al.*, 2009), pero el uso de estos piensos enriquecidos con selenio en animales también es común para la prevención de enfermedades, incrementar la productividad y facilitar la reproducción (Downs *et al.*, 2000).

En el caso de la acuicultura, al suplementar selenio en dietas para peces, tanto de fuentes orgánicas como inorgánicas, se han encontrado mejoras en variables productivas como ganancia de peso, conversión alimenticia, consumo de alimento y disminución de mortalidad en carpa *Carassius auratus* (Wang *et al.*, 2007), pez gato *Ictalurus punctatus* (Wang y Lovell, 1997), lubina estriada *Morone* sp. (Jaramillo *et al.*, 2008) y trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Küçükbay *et al.*, 2009). Además, se han identificado otros efectos positivos de los suplementos de selenio en las dietas de peces, como la atenuación del estrés oxidativo por alta densidad en la trucha arco iris (Küçükbay *et al.*, 2009).

Por tanto, es importante realizar investigaciones de suplementación con selenio empleando especies de importancia en la acuicultura para evaluar fuentes del mineral, biodisponibilidad, biotransformación, efecto del procesado o protocolos de producción. Este tipo de producto (alimento funcional) tendría acceso a nichos de mercado específicos, como los que existen para otros productos enriquecidos de origen pecuario (Vinchira y Muñoz-Ramírez, 2010).

1.2. LA ALMEJA FINA, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los moluscos bivalvos (lamelibranquios o pelecípodos) se distribuyen por todo el mundo, con aproximadamente 15.000 especies, tanto en hábitats marinos (10.000) como en agua dulce (5.000). Son de hábitos bentónicos y principalmente filtradoras, aunque hay especies detritívoras, simbiontes y parásitas, estando los cuatro tipos de alimentación de bivalvos definidos por su estructura branquial (Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007). Muchas especies de bivalvos son importantes para el hombre como fuente de alimento, por lo que tienen un gran interés comercial (como almejas, mejillones u ostras). Así mismo, la tolerancia y adaptabilidad de algunos bivalvos los han situado como los organismos preferidos en el monitoreo de la presencia de contaminantes, como indicadores de la calidad de los ecosistemas (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2002).

1.2.1.1. Taxonomía y morfología

Dentro de los moluscos, la almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) tiene la siguiente posición taxonómica (Gofas, 2014):

- Phylum: Mollusca
- Clase: Bilvavia
- Subclase: Heterodonta
- Superorden: Imparidentia
- Orden: Venerida
- Superfamilia: Veneroidea
- Familia: Veneridae
- Género: *Ruditapes*
- Especie: *Ruditapes decussatus*

A nivel morfológico, la almeja fina es un molusco bivalvo comprimido lateralmente que posee una concha con dos valvas, cuya composición es mayoritariamente a base de carbonato cálcico, articuladas dorsalmente por un ligamento (charnela) y que encierran totalmente el cuerpo blando del animal. Las valvas son similares, pero con simetría inequilateral. La cabeza no está diferenciada. El pie también está comprimido lateralmente.

La cavidad interna es muy espaciosa, con branquias muy grandes y con dos músculos aductores de tamaño similar (isomiaria) para el cierre de las valvas (Barnes, 1984).

1.2.1.2. Anatomía y fisiología

La anatomía interna de *Ruditapes decussatus* (Figura 1.4) se caracteriza por las siguientes estructuras internas y sistemas, descritas a continuación a partir de los trabajos de Barnes (1984), Gosling (2002), Helm *et al.* (2006) y Hill *et al.* (2006):

- Manto, que consiste en dos lóbulos de tejido, que engloban completamente el cuerpo del animal, unidos a la concha por la charnela pero sueltas en los bordes. Entre el manto y los órganos internos se forma una cavidad espaciosa (cavidad paleal). En la región posterior, los lóbulos del manto se unen y se extienden hacia el exterior para formar los sifones (uno inhalante y otro exhalante), que son largos, separados en toda su longitud y con tentáculos en el extremo. La retracción de los sifones la hace el músculo retractor del sifón, cuya impresión en la concha corresponde al seno paleal. El borde del manto está engrosado y tiene tres pliegues, el más interno es más muscular, el medio destaca por su función sensorial y el externo, principalmente, segrega la concha. El manto también puede controlar la entrada de agua en la cámara del cuerpo, iniciar el cierre de las valvas si fuera necesario y, además, tiene una función respiratoria.
- Músculos aductores. Son dos músculos de tamaño similar (dimiaria, isomiaria), se encuentran insertados cerca del margen anterior y posterior de las valvas, y cierran la concha actuando contra el ligamento, que activa el mecanismo de apertura de las valvas cuando el músculo se relaja.
- Pie. Es una estructura muscular bien desarrollada, situada en la base de la masa visceral, que utiliza para excavar y enterrarse en el sustrato, sujetarse y desplazarse.
- Branquias. Son órganos grandes en forma de lámina, que se utilizan para la respiración y para filtrar el alimento que transporta el agua. Hay dos pares de branquias a cada lado del cuerpo.

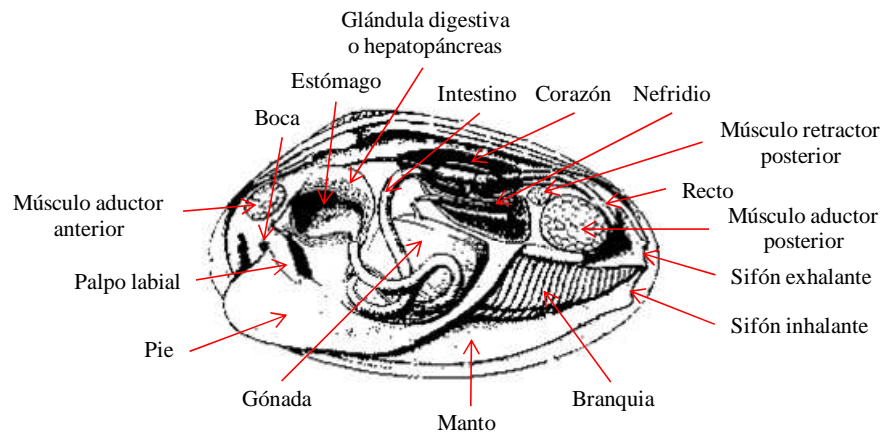


Figura 1.4. Anatomía interna de la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) (Modificado de Gosling (2002)).

- Aparato digestivo. El alimento que transporta el agua de la cavidad paleal es retenido por el mucus que secreta el manto y las branquias, y los cilios de estas estructuras lo dirigen hacia los palpos labiales, que rodean la boca y facilitan la introducción del alimento dentro de ella. Desde la boca, en el extremo anterior del animal, a través de un corto esófago, llega al estómago, rodeado por la glándula digestiva o hepatopáncreas, un órgano voluminoso de color oscuro, donde se produce una compleja serie de procesos. Presenta el estilete cristalino (tallo gelatinoso, sintetizado por el saco del estilete), en cada digestión crece dentro del saco del estilete y atraviesa el centro del estómago hasta alcanzar la pared anterior del estómago, introduce las hebras que contienen el alimento en el interior del estómago y lo fragmenta mecánicamente y por acción de sus enzimas digestivas (digestión extracelular). Los cilios del estómago trasladan el alimento hacia los divertículos digestivos (tubos ramificados de fondo ciego), donde se incorporan a las células que los tapizan, por endocitosis, y en ellas se produce la digestión intracelular y la absorción, los restos no vuelven al estómago y continúan hacia el intestino, el cual termina en el ano, cerca del músculo aductor posterior. Cuando las partículas son rechazadas inicialmente por los palpos son eliminadas como “pseudoheces”.
- Aparato circulatorio. Es simple, con circulación abierta. El corazón está envuelto en una cavidad pericárdica, con dos aurículas y un ventrículo. La hemolinfa es bombeada a través de las arterias, que se ramifican a lo largo del cuerpo, y desembocan en los senos lagunares, desde los cuales la hemolinfa es llevada a los riñones para su purificación y se devuelve al corazón a través de las branquias y el manto donde se re-oxigena.
- Aparato respiratorio: La branquia tiene una estructura compleja, con un aumento adicional de la superficie respecto a otros bivalvos, gracias al desarrollo en sus láminas de

pliegues y crestas. Su elevada superficie, así como su abundante provisión de hemolinfa, la hacen adecuada para el intercambio de gases, el cual se produce a medida que el agua se mueve dorsalmente por las branquias. El intercambio gaseoso también puede realizarse en la superficie del manto.

- Aparato urogenital. Es una especie dioica, con fecundación externa, y sin dimorfismo sexual, por lo que la determinación del sexo debe hacerse por examen microscópico o durante la liberación de gametos. Las gónadas rodean las asas intestinales, siendo su estructura difusa en el estado de reposo sexual, pero que envuelve toda la glándula digestiva, ocupando una gran parte del cuerpo, en la época de puesta. El sistema renal, difícil de observar, está constituido por un par de nefridios que purifican la hemolinfa.
- Sistema nervioso. Es bilateral y se compone de tres pares de ganglios y dos pares de cordones nerviosos largos. Los dos ganglios cerebropleurales supraesofágicos poseen ambos un cordón nervioso posterior que inerva las vísceras y conecta con un par de ganglios viscerales y otro cordón más ventral que inerva el pie y conecta con un par de ganglios pedales.

1.2.1.3. Distribución y hábitat

La almeja fina se distribuye por el Atlántico oriental, desde Noruega hasta Senegal, y a lo largo de la cuenca Mediterránea alcanzando el norte del Mar Rojo (Poutiers, 1987). (Figura 1.5)

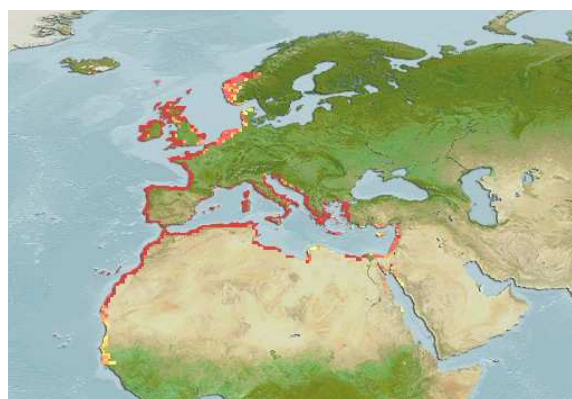


Figura 1.5. Distribución geográfica de la almeja fina

(Computer generated distribution maps for *Ruditapes decussatus* (un-reviewed).
www.aquamaps.org Data sources: GBIF OBIS, version of Aug. 2013)

Su hábitat son las aguas someras de la zona intermareal o submareal. Habita fondos de arena limpia, areno-fangosa o mezclada con cascajos. La almeja suele aparecer en lugares abrigados o semiabrigados y poco profundos: bahías, estuarios, desembocaduras de ríos, así como en lagunas litorales comunicadas con el mar (Royo, 1986). Los sifones les permiten vivir enterradas hasta 15-20 cm. de profundidad y soportar mejor los periodos de desecación de la bajamar y las bajadas de salinidad (FAO, 2005).

1.2.2. LOS MOLUSCOS BIVALVOS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA

La moluscos bivalvos en la alimentación humana tienen importancia por su alto valor nutricional, debido a su composición bioquímica, tanto a nivel proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos), como a nivel de nutrientes esenciales, que el metabolismo humano no puede sintetizar o los sintetiza en cantidad insuficiente (aminoácidos, ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), vitaminas y antioxidantes) (Farías, 2008). Esta composición bioquímica dependerá de las condiciones ambientales en las que se desarrollen los individuos, por lo que se verá afectada por múltiples factores; entre ellos podemos destacar la época del año (Urrutia *et al.*, 2001; Pardeshi, 2015), la zona geográfica (Ahn *et al.*, 2000), la gametogénesis (Ojea *et al.*, 2004), la profundidad (Freites *et al.*, 2002) y las variaciones en su dieta (Farías, 2001).

Existen múltiples tablas de composición de alimentos (Ortega *et al.* 2004; MAGRAMA, 2012; Moreiras *et al.*, 2016), y aunque entre ellas podemos encontrar diferencias debidas a los factores expuestos anteriormente, nos pueden proporcionar unos valores estimados de la composición de los bivalvos (Tabla 1.3):

Tabla 1.3: Composición de los moluscos bivalvos (MAGRAMA y ANFACO-CECOPESCA, 2012)

Nutrientes	Declaraciones Nutricionales
Proteínas	Alto contenido de proteínas
Grasas	Bajo contenido de grasas saturadas Alto contenido de ácidos grasos omega-3
Vitaminas	Fuente de tiamina ¹ Fuente o alto contenido de riboflavina ¹ Fuente de niacina Alto contenido de vitamina B12
Minerales	Fuente de calcio ¹ Alto contenido de cobre Fuente o alto contenido de fósforo Alto contenido de hierro Fuente de magnesio ¹ Fuente o alto contenido de manganeso ¹ Fuente de potasio Alto contenido de selenio Fuente o alto contenido de yodo ¹ Fuente de zinc

¹ Declaración nutricional no aplicable a todas las especies del grupo

Nota: Declaración nutricional: cualquier declaración que afirme, sugiera o de a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo del aporte energético (valor calórico).

Se debe resaltar también que los bivalvos son una excelente fuente de proteínas, el contenido proteico de los adultos es alrededor del 48,1 % del peso seco, mientras los lípidos son el 5,6 % y los carbohidratos el 15 % (Ojea *et al.*, 2004), siendo sus lípidos de alto valor nutricional, ya que el contenido de colesterol es inferior al 5 % del total, mientras que los contenidos de fosfolípidos pueden llegar a ser del 27 %, similar a los triglicéridos, que alcanzan al 32 % de los lípidos totales (Farías, 2008).

1.2.3. LA PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS

Las especies o grupos de especies producidas, así como la composición por especies del abastecimiento para el consumo humano, varían según el continente, los países y las regiones. Esto es debido a una amplia gama de factores como son la disponibilidad y el coste del pescado, la accesibilidad de los recursos pesqueros en sus aguas, la renta disponible y los factores socioeconómicos y culturales, las tradiciones y los hábitos alimentarios, los gustos, la demanda, las estaciones, los precios, la comercialización, la

infraestructura y los servicios de comunicación (FAO, 2016). Por estas mismas razones, también hay entre ellos una importante diferencia en lo referente a la cantidad y variedad consumida *per cápita*.

Los moluscos bivalvos han sido consumidos por el hombre desde hace 164.000 años, como lo han revelado los restos que se han encontrado en las cuevas y abrigos habitados en la prehistoria (Marean, 2010), siendo además de los primeros grupos de especies que se cultivaron, hallándose documentados cultivos ostrícolas hacia el año 460 a. C. en China (Ranson, 1951).

Al mismo tiempo, los moluscos bivalvos son importantes desde el punto de vista del medio ambiente y de la seguridad alimentaria, ya que son especies animales que se alimentan por filtración (“no alimentadas”) y el propio Subcomité de Acuicultura del Comité de Pesca de la FAO (COFI) ha recomendado, que la Iniciativa sobre el crecimiento azul (iniciativa intersectorial para promover la utilización sostenible y la conservación de los recursos acuáticos renovables de manera económica, social y ambientalmente responsable) “(...) se centrare no solo en las estrategias encaminadas a reducir las repercusiones negativas de la acuicultura, sino también en potenciar al máximo los efectos positivos de la acuicultura en el medio ambiente a través de, por ejemplo, el cultivo de moluscos bivalvos y algas” (FAO, 2015).

Actualmente, los moluscos son un recurso económico importante en un contexto mundial (Gaspar, 2012). Los bivalvos suponen el 8,3 % de la producción global (196 millones de toneladas entre pesca y acuicultura), y el 16% de la producción acuícola, representada en esta última con 86 especies de bivalvos, lo que supone el 15% del total de especies o grupos de especies que se cultivan o se han cultivado (FAO, 2015; 2016).

La producción mundial de moluscos bivalvos ha crecido de forma sostenida con una tasa media anual de 6,5 % en el período comprendido entre 1983 y 2014, pasando de casi un millón de toneladas en 1950 a unos 16,3 millones de toneladas en 2014 (Figura1.6).

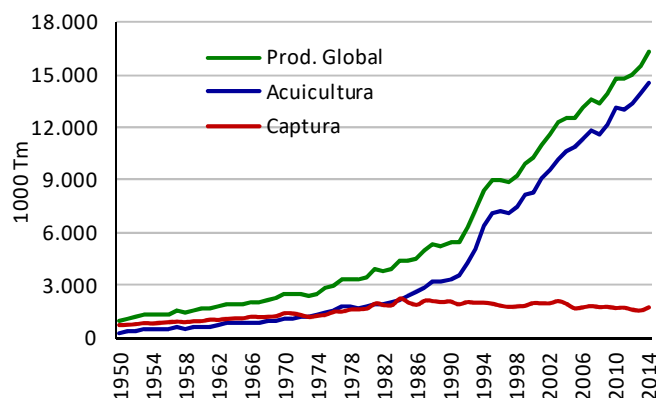


Figura 1.6. Evolución de la producción mundial de moluscos bivalvos (FAO, 2016)

El mayor productor de bivalvos es China, con 12 millones de toneladas en 2014, cinco veces mayor que la del resto del mundo. En Europa la producción de moluscos bivalvos sumó 823.712 toneladas ese mismo año (Figura 1.7), siendo el principal país productor España con el 28,4 %, seguido de Francia e Italia (FAO, 2016). Estos tres países representaron en el año 2013 algo más del 78 % del total de la producción europea de moluscos de acuicultura. Aunque esta producción acuícola ha experimentado desde 1999 una disminución en la cuantía de su cosecha (de 826.140 a 623.269 t), su valor económico, sin embargo, se ha ido incrementado hasta los actuales valores (1.180 millones de euros) (APROMAR, 2016).

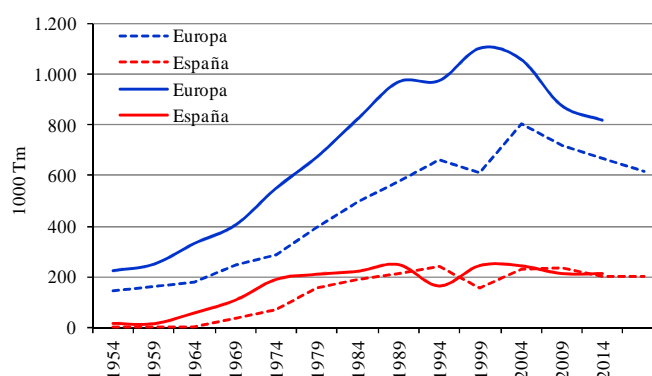


Figura 1.7. Evolución de la producción total (línea continua) y de la producción acuícola (línea discontinua) de moluscos bivalvos en Europa y España, como promedios móviles de 5 años para atenuar oscilaciones (datos: FAO, 2016)

En España, la acuicultura del mejillón tuvo en 2014 el 79,1 % de la producción total de moluscos, le siguieron en producción las ostras (el 14,75 %) y las almejas (el 5,75 %). En cuanto al valor económico en primera venta, la producción de mejillón fue de casi 117,5 millones de euros, y le siguieron la producción de almeja con 8 millones de euros, con tres

especies cultivadas: fina, babosa y japonesa, y las ostras con 4,2 millones de euros, con dos especies: plana y japonesa (APROMAR, 2016).

En Andalucía, en 2014, es también el mejillón el principal bivalvo de cultivo, con un valor económico en primera venta de 697.142 euros, el 73,36% del valor total de los bivalvos, y el segundo grupo en importancia serían las almejas, que suponen el 18,31 % con dos especies cultivadas, japonesa *Ruditapes philippinarum* y fina *Ruditapes decussatus*. El 97% de estas almejas de cultivo se producen en Huelva, con un valor económico en primera venta de 164.370 euros y una producción de 33.523 kg (CAPDER, 2016).

1.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE ACUMULACIÓN DE METALES EN MATRICES BIOLÓGICAS

1.3.1. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN A METALES

Los estudios de exposición de un organismo a un elemento tóxico, vienen determinados por la evaluación de los procesos de bioacumulación, biotransformación y bioeliminación del elemento implicados en el organismo. El procedimiento más empleado para realizar esta evaluación son los bioensayos, que consisten en ensayos realizados en organismos (uniespecíficos) en condiciones controladas. Otros tipos de procedimientos empleados son los microcosmos (ensayo de toxicidad multiespecífico realizado en condiciones controladas de laboratorio) y los mesocosmos (ensayo de toxicidad multiespecífico realizado en condiciones controladas en campo).

Los bioensayos de toxicidad en moluscos habitualmente se realizan en sistemas experimentales con volúmenes de agua pequeños (1 - 80 L), con agua artificial o natural filtrada, dulce o salada, dependiendo del organismo con el que se realiza el ensayo, y según los cambios de agua que se realizan durante los experimentos se clasifican en renovables (un porcentaje del volumen de agua cada 24 - 48h), de flujo continuo y estáticos. Previamente al experimento, los individuos necesarios para el ensayo se recolectan, se limpian y se mantienen en tanques con agua, aireación continua y alimento durante 1 - 4 semanas para aclimatarlos a las condiciones del ensayo (Chanduverlan *et al.*, 2012; Falfushynska *et al.*, 2013; Pouil *et al.*, 2015; Velez *et al.*, 2016).

La toxicación se puede llevar a cabo con distintas especies químicas del elemento, tanto inorgánicas como orgánicas, así como con radiosondas (isotopos radioactivos). Los factores clave que determinan en la toxicación la respuesta de un organismo al tóxico son la vía de exposición, el nivel de exposición y la duración de la exposición. La vía de exposición puede ser el agua, el alimento o el sedimento. El nivel de exposición y la duración suelen ir ligados, siendo los estudios agudos a corto plazo (hasta 96 horas o 1 semana) los que emplean altas concentraciones del elemento que pueden potencialmente agotar la capacidad del organismo para regular la acumulación del tóxico y/o inducir mecanismos de defensa para sobrevivir pero que, probablemente, no son indicativos de la mayoría de las exposiciones naturales. Sin embargo, el estudio de las respuestas a la toxicidad aguda ofrece una visión general de los mecanismos de toxicidad y/o defensa. Por el contrario, las exposiciones crónicas o subcrónicas (a partir de 1 mes) pueden ser más representativas de una exposición ambiental ya que el examen de las respuestas durante un período más largo, a una menor concentración de exposición, esclarece los mecanismos que permiten al organismo adaptarse y responder a la presencia de un contaminante metálico, como los elementos traza (Naimo, 1995).

La exposición aguda o crónica al tóxico pueden causar daños o efectos fisiológicos en los organismos así como daños morfológicos, y frecuentemente presentan evidencias de estrés. Los parámetros para estudiar estos efectos son la mortalidad, que puede incluir concentración letal (LC50), concentración del tóxico que provoca la muerte del 50% de los individuos, o la dosis letal (LD50), cantidad del tóxico que provoca la muerte en el 50% de los individuos (Howe *et al.*, 2014; Gissi *et al.*, 2016); la bioacumulación (a nivel del organismo completo, de tejidos y/o de la distribución subcelular) y depuración, con el desarrollo de su toxicocinética (Pouil *et al.*, 2015; Velez *et al.*, 2016; Hédouin *et al.*, 2017); los efectos histopatológicos (Yavaşoğlu *et al.*, 2016; Baqueiro *et al.*, 2007); los parámetros bioquímicos, enzimáticos y fisiológicos (Neuberger-Cywiak *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2012; Taylor y Maher, 2014; Volland *et al.*, 2015; Kowalczyk-Pecka *et al.*, 2017) y sobre la expresión génica (Taylor *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

Las respuestas fisiológicas al estrés en los bivalvos, como las tasas de aclaramiento, filtración, respiración, alimentación o las interacciones de antioxidantes y enzimas defensivas, proporcionan información valiosa sobre la condición de los organismos (Baird *et al.*, 2007; Pascoe *et al.*, 2009)). La inhibición de la tasa de aclaramiento o la actividad de

algunas enzimas redox y la producción de peróxidos de hidrógeno pueden usarse como un indicador sensible de la exposición a los contaminantes, ya que podría detectar los efectos del estrés a niveles más bajos que la tasa de mortalidad, indicando estos efectos sub-letales que se están dando en condiciones tóxicas (McLoughlin *et al.*, 2000; Neuberger-Cywiak *et al.*, 2007; Melvin y Wilson, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Martinez-Haro *et al.*, 2016).

1.3.2. CINÉTICA DE LA BIOACUMULACIÓN

El modelo toxicocinético de un metal describe cuantitativamente los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción en función del tiempo. Algunas veces son denominados modelos metabólicos, y pueden ayudarnos de una manera general a entender la aparición de los efectos adversos en los organismos por los compuestos químicos. Estos modelos pueden ser de gran valor porque proporcionan un medio para calcular las relaciones dosis-respuesta esperadas (Elder *et al.*, 2015).

El factor de bioconcentración es el parámetro más utilizado para evaluar la capacidad de acumulación de un contaminante por organismos vivos (Tsuda *et al.*, 1998). El factor de bioconcentración (BCF) es el grado de concentración de una sustancia tóxica en un organismo acuático, y se calcula como el cociente entre la concentración máxima de la sustancia testada en el organismo y la concentración de la misma en el medio de exposición, alcanzado el estado estacionario. Los factores de bioacumulación (BAF) son una medida de la absorción combinada desde todas las vías de exposición. Dada la importancia de la dieta como vía de absorción del selenio en todos los organismos consumidores, los BAF son de mayor relevancia que los BCF para evaluar la bioacumulación de selenio. Por supuesto, para los productores primarios, los BCFs son indicadores relevantes de la bioacumulación porque el agua es la única vía de absorción para el selenio (Environment Canada and Health Canada, 2015).

En el modelo cinético que trata la acumulación de contaminantes como un proceso fisiológico de primer orden (Wang y Fisher, 1997), los parámetros fisiológicos específicos de metales pueden medirse experimentalmente y luego incorporarse para predecir las concentraciones de metales en los animales. El modelo generalmente asume condiciones de estado estacionario, pero también puede aplicarse para estudiar la acumulación de metal

en condiciones no estacionarias resultantes de las variaciones temporales de la entrada de metal en el cuerpo de agua (Wang y Fisher, 1999).

El modelo para la bioconcentración del tóxico desde el agua se podría expresar como un balance entre la absorción y la eliminación del mismo, es decir, entre el organismo acuático y el selenio presente el medio (Luoma y Rainbow, 2005), este modelo sigue una cinética de primer orden de dos compartimentos según la ecuación (1):

$$dC_{\text{org}}/dt = (K_1 \cdot C_w) - (K_2 \cdot C_{\text{org}}) \quad (1)$$

Donde C_{org} es la concentración del tóxico en el organismo (g Kg^{-1}), C_w es su concentración en el agua (g L^{-1}), k_1 es la constante de la velocidad de absorción del tóxico desde el agua ($\text{L Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y k_2 es la constante de la velocidad de eliminación del organismo (día^{-1}). Cuando la concentración del tóxico en el agua de exposición se mantiene constante durante el periodo de exposición (t) e integrándose la ecuación 1, la variación en el organismo podría describirse por la siguiente ecuación (2):

$$C_{\text{org}} = \left(\frac{k_1}{k_2}\right) \cdot C_w \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad (2)$$

Cuando se alcanza el estado estacionario, ambas concentraciones serán constantes durante el tiempo de exposición y se alcanza el equilibrio, por lo tanto de la ecuación 1 obtendríamos:

$$dC_{\text{org}}/dt = 0 \quad C_{\text{org}} = \left(\frac{k_1}{k_2}\right) \cdot C_w$$

El factor de bioconcentración (BCF) se puede calcular como: $BCF = \frac{k_1}{k_2}$

Los modelos biodinámicos simplificados actuales explican ambos caminos de acumulación de metales, tanto desde el agua como desde los alimentos. En un modelo de primer orden, la absorción desde las dos fuentes se determina sumando la tasa de absorción unidireccional desde agua ($K_1 C_w$) y la tasa de absorción unidireccional desde los alimentos ($K_d C_d$), se podría expresar por la ecuación (3):

$$dC_{\text{org}}/dt = (k_1 \cdot C_w + k_d \cdot C_d) - (k_2 \cdot C_{\text{org}}) \quad (3)$$

Donde C_d es la concentración de la sustancia química en la dieta (g/Kg), k_d es la constante de la tasa de absorción del especie químico desde la dieta ($\text{Kg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$)

En el estado estacionario obtendríamos el factor de bioacumulación (BAF):

$$\text{BAF} = \frac{C_{\text{org}}}{C_w} = \left[k_1 + k_d \cdot \left(\frac{C_d}{C_w} \right) \right] / k_2$$

Pero la acumulación de un tóxico por un organismo únicamente a partir de la dieta se expresa como un balance de masas entre su capacidad para acumularla y eliminarla:

$$C_{\text{org}} = (k_d \cdot C_d) - (k_2 \cdot C_{\text{org}})$$

El modelo también sigue una cinética de primer orden e intervienen dos parámetros fisiológicos: la tasa de ingestión a través de la dieta, IR, (cantidad ingerida por unidad de tiempo) y la eficiencia de asimilación, AE, (fracción total de sustancia retenida en el organismo) que se pueden obtener durante los ensayos bajo condiciones controladas:

$$k_d = \text{AE} \times \text{IR}$$

$$\text{AE} = \left[\frac{C_{\text{org}}}{(C_{\text{org}} + C_{\text{heces}})} \right] \times 100$$

$$\text{IR} = \frac{(C_{\text{org}} + C_{\text{heces}})}{C_{\text{org}} \cdot \text{PS}_{\text{org}} \cdot t}$$

Donde C_{heces} , es la concentración del tóxico retenida en las heces, PS_{ORG} es el peso seco del organismo y t, es el tiempo de exposición al tóxico.

Por otro lado, la fase de depuración, donde la C_w es cero, puede ajustarse a una ecuación cinética de primer orden (Barron *et al.*, 1990), reduciéndose la ecuación (1) a:

$$dC_{\text{org}}/dt = -(K_2 \cdot C_{\text{org}})$$

Que podemos expresarlo como:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_2 t}$$

Donde C_t y C_0 son las concentraciones de Se (mg Se Kg^{-1}) a tiempo t y 0 (inicio de la eliminación), respectivamente, k_2 es la constante de velocidad de depuración biológica, y se puede calcular la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) a partir de:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2}$$

O un modelo exponencial de doble componente:

$$C_t = C_{0s} e^{-k_{es} \cdot t} + C_{0l} e^{-k_{el} \cdot t}$$

Donde C_{0s} y C_{0l} son las concentraciones de Se (mg Se Kg^{-1}) a tiempo cero para una componte de vida media corta (s) y una de vida media larga (l), and k_e es la constante de velocidad de depuración biológica (día^{-1}).

Se ha demostrado que los estudios toxicocinéticos son esenciales para realizar modelos reales de la acumulación de metales en organismos acuáticos (Reinfelder *et al.*, 1998; Wang y Fisher, 1999).

Además, los efectos biológicos del estrés ambiental, en general, y de la exposición a los contaminantes, en particular, son medibles en varios niveles de organización biológica (desde el nivel molecular al ecosistema), el orden secuencial de respuestas al estrés contaminante dentro de un sistema biológico se representa en la Figura 1.8 (van der Oost *et al.*, 2003; Taylor, 2009).



Figura 1.8 Representación esquemática del orden secuencial de respuestas al estrés tóxico dentro de un sistema biológico. Modificado de Bayne *et al.*, (1985) por Taylor (2009)

Un elemento absorbido por un organismo se distribuye a diferentes tejidos y el análisis de los niveles de bioacumulación en estos, reflejará cómo les afecta la exposición, a corto o largo plazo, lo que dependerá del tiempo de retención del elemento y de la especiación en ese tejido (Klaassen, 2001; van der Oost *et al.*, 2003; Poletini *et al.*, 2015). Por lo tanto, la diferente cinética de absorción del tóxico por distintos órganos se interpreta como el resultado de la actividad fisiológica específica de cada órgano. El uso más importante de estos modelos cinéticos es el cálculo de la concentración en el órgano crítico (es decir, el órgano más sensible) bajo diversas condiciones de exposición, mientras que las concentraciones de metales en otros órganos o tejidos proporcionan una indicación de los efectos adversos (Elder *et al.*, 2015).

Por otra parte, la separación subcelular de metales en invertebrados acuáticos refleja el procedimiento interno que ocurre durante la acumulación de metales y puede proporcionar información sobre la toxicidad y tolerancia del organismo a esos metales (Roesijadi, 1980; Jenkins y Mason, 1988; Klerks y Bartholomew, 1991), por lo que es necesario estudiar la dinámica de su acumulación a nivel subcelular, ya que los efectos fisiológicos y la toxicidad de los metales traza dependen fuertemente de su localización intracelular y su unión a orgánulos y ligandos.

Las mitocondrias son el objetivo intracelular clave para la toxicidad del metal, ya que son muy sensibles a las exposiciones de metales (Sokolova, 2004). Otros compartimentos intracelulares clave implicados en la acumulación de metales traza, son los lisosomas y el citoplasma. Los lisosomas son un orgánulo importante en los moluscos porque en él se sequestran los metales, especialmente en los tejidos del hepatopáncreas (ricos en lisosomas) (Marigomez *et al.*, 2002). Los metales acumulados pueden ser incorporados en gránulos insolubles derivados de lisosomas y ser almacenados intracelularmente o excretados desde la célula y, por lo tanto, detoxificados. En el citoplasma, las metalotioneínas, que son proteínas de enlace metálico ricas en cisteína, de bajo peso molecular, constituyen otro importante mecanismo de detoxificación que puede servir para minimizar la disponibilidad de iones metálicos en componentes citosólicos (Sokolova *et al.*, 2005).

Por lo tanto, las manifestaciones de toxicidad subletal pueden coincidir con los cambios en la separación subcelular, particularmente, en sistemas de detoxificación de metales (Brown y Parsons, 1978; Sanders *et al.*, 1983).

1.3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINACIÓN DE SELENIO. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.

En un organismo expuesto al selenio hay que tener en cuenta tanto su capacidad de acumulación, determinando su contenido total de selenio, como que una vez absorbido puede realizarse la biotransformación del elemento, dando lugar a la formación de distintas especies químicas. La especiación química ha sido definida, en forma general, como el proceso de identificación y cuantificación de las formas químicas de un mismo elemento en una muestra dada (Hlavay, 2004). Las diferentes propiedades químicas de los distintos grados de oxidación son de importancia fundamental para sus características tóxicas o beneficiosas, por ello es de gran interés el conocimiento de las diferentes especies químicas, y no solo el contenido total del elemento (Camean, 1995).

1.3.3.1. Determinación de Se total

Las bajas concentraciones de selenio (ng g^{-1}) que normalmente se dan en muestras biológicas requieren técnicas analíticas sensibles y precisas, que además eviten la pérdida de compuestos volátiles de selenio durante el proceso.

Aparte del análisis de activación de neutrones (NAA) y de fluorescencia de rayos X, la mayoría de los métodos analíticos se basan en la digestión ácida, previa a la determinación del contenido total de selenio. Este procedimiento puede realizarse en vasos abiertos, que involucran el calentamiento de la muestras en ácido por períodos largos (las mezclas más comúnmente utilizadas son $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HClO}_4$ y $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$) o en sistemas cerrados, donde la descomposición puede realizarse bajo temperatura y presión elevadas, que reducen significativamente el tiempo de digestión, como en los recipientes de digestión ácida (reactores) calentados con microondas, que permiten una rápida digestión (10-20 min) de la mayoría de las muestras biológicas usando sólo HNO_3 y H_2O_2 , y además, se elimina el riesgo de pérdida de elementos volátiles (Kastenmayer, 1997; ATSDR, 2003)

El selenio se puede cuantificar a partir de muchos tipos de técnicas, como la espectrometría de absorción atómica (AAS), de emisión atómica (AES), de fluorescencia atómica (AFS), de masas (MS), así como plasma acoplado inductivamente, ICP-AES e ICP-MS, cromatografía de gases (GC) y análisis de activación usando neutrones o protones (ATSDR, 2003; Alexander, 2015).

1.3.3.2. Especiación de selenio

El selenio está presente en las muestras biológicas y alimentos a concentraciones muy bajas (excepto en algunos alimentos selenizados, como la Se-levadura) y se distribuye en una amplia variedad de especies de selenio. Por lo tanto, las especies de selenio deben ser:

- 1) extraídas cuantitativamente de la matriz sin cambiar la forma de la especie original,
- 2) separadas las especies e
- 3) identificadas inequívocamente y cuantificadas correctamente.

Uno de los principales problemas para evaluar la exactitud es la falta de estándares de selenocompuestos disponibles y de materiales de referencia certificados.

El selenio en muestras biológicas y alimentos se presenta principalmente como selenoaminoácidos, incorporados o no a proteínas. La liberación de estos de las proteínas puede realizarse por hidrólisis ácida, básica o enzimática, siendo esta última la más habitual para la extracción de selenoaminoácidos de las muestras.

El método de hidrólisis enzimática para la extracción de especies de selenio en muestras biológicas permite extracciones en condiciones moderadas de temperatura (37 °C) y pH (7,0), evitando la degradación de la especie original. Las enzimas proteolíticas: proteinasa K (Kannakumarath *et al.*, 2002; Vonderheide *et al.*, 2002), subtilisina (Moreno *et al.*, 2004; Quijano *et al.*, 2000), pepsina (Dernovics *et al.*, 2002; Stefanka *et al.*, 2001) y proteasa (Larsen *et al.*, 2003; Uden *et al.*, 2004) o una mezcla de enzimas proteolíticas (proteasa y lipasa), se han aplicado ampliamente en una gran variedad de muestras para extracción de selenoaminoácidos incorporados a proteínas mediante la rotura de los enlaces peptídicos. Por el contrario, para la extracción de aminoácidos no proteínicos (selenometilselenocisteína o γ -glutamilselenometilselenocisteína), la eficiencia es similar

se use o no la extracción enzimática (Montes-Bayon *et al.*, 2006). El empleo del procedimiento de extracción secuencial mediante la adición de reactivos extractantes secuencialmente es una herramienta útil para mejorar la comprensión de cómo y dónde está presente el selenio en las muestras; por ejemplo se ha utilizado para digestiones gastrointestinal *in vitro* (Luten *et al.*, 1987), digestión gástrica (pepsina) y digestión gastrointestinal (el residuo resultante de la anterior se trata con una mezcla de pancreatina y amilasa). Además, con el fin de disminuir el tiempo de tratamiento de la muestra, se han realizado distintas propuestas: el uso de la sonda ultrasónica durante la incubación enzimática, que ha permitido reducir el tiempo del tratamiento de la muestra desde 24-48h a minutos, ya que favorece el contacto entre las enzimas y los componentes celulares (Capelo *et al.*, 2004); o la extracción con líquidos presurizados (PLE), técnica que se ha aplicado para el estaño y el arsénico a partir de matrices biológicas, pero muy poco para el selenio (las especies de selenio se extrajeron en minutos da partir de muestras de levadura utilizando una mezcla de agua:metanol (Gomez-Ariza *et al.*, 2004).

Una vez que las especies han sido aisladas de la matriz deben ser separadas, identificadas y cuantificadas. El éxito de la especiación depende de dos factores: la selectividad (fiabilidad de determinar la especie adecuada) y la sensibilidad (debe coincidir con el nivel de los analitos en las muestras). En el análisis de especiación se utilizan técnicas hifenadas que permiten identificar y cuantificar las especies individuales en tiempo real, combinando una potente técnica de separación con un detector extremadamente sensible (Pedrero y Madrid, 2009).

Las técnicas utilizadas para la separación de las especies de selenio en los extractos de muestras biológicas y alimentos son:

- La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en los modos de intercambio iónico (Larsen *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2001), par iónico de fase reversa (Zheng *et al.*, 2003; Uden *et al.*, 2004), vesicular (Ipolyi *et al.*, 2001), exclusión por tamaño (Önning y Bergdahl, 1999) y quiral (Ponce de León *et al.*, 2000), siendo el modo de par iónico el que consigue separar un mayor número de especies.
- La electroforesis capilar (CE). Para las de especies iónicas basta emplear un electrolito, por ejemplo, una disolución reguladora de fosfato (Albert *et al.*, 1995). Sin

embargo, para la resolución de mezclas más complejas de oxoaniones de selenio y selenoaminoácidos (como SeMet y SeCys) es necesario modificar el flujo electrosmótico con surfactantes catiónicos, como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Zheng *et al.*, 2000), bromuro de trimetiltetradecilamonio (TTAB) (Albert *et al.*, 1995), hidróxido de trimetiltetradecilamonio (TTAOH) (Gilon y Potin-Gautier, 1996) o fosfato de hexadeciltriethylamonio (HDTA) (Hagege *et al.*, 1997), o con surfactantes (SDS) y β -ciclodextrinas (Sutton *et al.*, 2000)

- La cromatografía de gases (GC) para la especiación de compuestos de selenio no volátiles. Este método necesita una reacción de derivatización para convertir los selenoaminoácidos a compuestos volátiles. N(O,S)-acil alquil ester ha sido usado como derivado de selenoaminoácidos (Peláez *et al.*, 2000), para ello estos derivados se forman en dos etapas: la esterificación del grupo carboxílico ácido con un alcohol, seguido por la acilación del grupo amino con un anhídrido. Alquil cloroformatos (Haberhauer-Troyer *et al.*, 2003; Kahakachchi *et al.*, 2004) han sido utilizados también como reactivos derivatizantes para aminoácidos obteniéndose el ester N(O,S)-alquiloxy-carbonil-alquil éster en una simple reacción.

Los sistemas de detección que se emplean en cromatografía líquida son los basados en la absorción atómica de llama (FAAS) (Maranhão *et al.*, 2011), la electrotérmica (ET-AAS) (Marval-León *et al.*, 2012), la fluorescencia atómica (AFS) (Sánchez-Rodas *et al.*, 2016), la emisión atómica con plasma de acoplamiento inducido (ICP-AES) (Yin *et al.*, 2016) y la espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma (ICP-MS) (Jagtap y Maher, 2015) y de ionización con electrospray (EI-MS) (Tang *et al.*, 2011). Estos sistemas suelen ser suficientemente sensibles y selectivos, proporcionando los mejores límites de detección la ICP-MS (ng L^{-1}). En general, la sensibilidad y la selectividad se pueden mejorar con la derivatización de las especies de selenio a hidruro de selenio (HG) previa a la detección mediante FAAS (Cabral de Lima *et al.*, 2013; Altunay y Gürkan, 2016), AFS (Tang *et al.*, 2005), ICP-AES (Qiu *et al.*, 2007) o ICP-MS (Forrest *et al.*, 2009). Sin embargo, son la espectrometría de masas con la ionización de electrospray (ES-MS) (Lu *et al.*, 2012) y la espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) (Jayasinghe y Caruso, 2011) las que permiten investigar de forma más directa la estructura de los compuestos de selenio. Con la cromatografía de gases se utilizan el

detector fotométrico de llama (FID) (Elguera *et al.*, 2013), la emisión atómica (AED) (Amoako *et al.*, 2009) o la espectrometría de masas (MS) (Guadayol *et al.*, 2016).

Capítulo 2.

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es estudiar la acumulación, biotransformación y eliminación de compuestos de selenio en organismos marinos, tomando como especie modelo almeja fina (*Ruditapes decussatus*), y los efectos según las estrategias de administración de estos. Estas estrategias se han basado en factores como el tiempo de exposición (a corto y largo plazo), la especie de selenio (inorgánica y orgánica) y la forma de administración (vía agua y alimento y a distintas concentraciones).

Para alcanzar este objetivo general se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la acumulación, biotransformación y eliminación del selenito a través del medio acuático en el rango de concentraciones comprendido entre 250 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$.
2. Estudiar la acumulación, biotransformación y eliminación de la selenometionina a través del medio acuático en el rango de concentraciones comprendido entre 5 y 50 $\mu\text{g Se L}^{-1}$.
3. Estudiar la acumulación, biotransformación y eliminación de la selenometilselenocisteína a través del medio acuático en el rango de concentraciones comprendido entre 250 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$.
4. Estudiar la acumulación, biotransformación y eliminación de las distintas especies del selenio aportadas a través del alimento (microalgas Tiso) en el rango de concentración comprendido entre 0 y 4,37 $\mu\text{g Se Kg}^{-1}$.

En el desarrollo de los objetivos específicos ha sido necesario:

- Evaluar los efectos fisiológicos y la mortalidad, como efectos subletales y letales, respecto a las concentraciones de selenio en los individuos.
- Determinar la concentración de selenio total y especiación en el cuerpo blando completo, en los tejidos de la almeja fina y en las fracciones subcelulares.

Capítulo 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1. CULTIVOS DE ALMEJA FINA (*Ruditapes decussatus*)

3.1.1.1. Condiciones del cultivo

Las almejas fueron obtenidas de forma manual en los bancos naturales de río Carreras (Isla Cristina, Huelva) y se recibieron en el IFAPA Centro Agua del Pino (El Rompido-Huelva) en menos de 18 horas. Se recibieron dos lotes de individuos de tallas entre 30 y 41 mm de longitud ($n_1=750$; $n_2=2270$), con longitudes y peso iniciales de $32,51\pm 2,1$ mm y $7,50\pm 1,76$ g; $33,37\pm 2,29$ mm y $8,20\pm 1,69$ g (media \pm desviación estándar), respectivamente. Previo a su muestreo, las almejas fueron lavadas mecánicamente con agua de mar para eliminar los epibiontes y el fango adherido a sus valvas.

Los experimentos de acumulación se llevaron a cabo en la empresa Salinas del Astur (Punta Umbría), dentro del Paraje Natural Marismas del Odiel. Los ejemplares fueron aclimatados durante una semana a las condiciones del sistema experimental, en tanques (65 L) con agua de mar en circuito cerrado y renovación diaria del 100 % del agua. El abastecimiento de agua se realizaba por medio de un depósito de polipropileno de 10 m^3 (Figura 3.1), en el que se almacenaba y decantaba el agua de mar durante dos semanas, realizándose un filtrado previo a su uso (filtro de bolsa de $10\text{ }\mu\text{m}$) ($33,4\pm 2\text{ }\%$). Previamente a la experimentación se determinó la concentración de selenio en dicho agua de mar, no detectándose niveles del mismo. Durante el cultivo se mantuvo aireación continua en los tanques, por medio de aireadores (EHEIM air pump 200, GmbH & Co. KG Deizisau, Alemania), para asegurar una buena mezcla de algas y de saturación de oxígeno y mantener la función respiratoria de las almejas.

Después del período de aclimatación, los individuos fueron divididos en lotes al azar (85 almejas por grupo) y se ubicaron en tanques de 65 L de capacidad, 2 almejas L^{-1} , con agua de mar natural filtrada en el caso del control y de los lotes expuestos a Se en la dieta y con agua de mar filtrada tratada con selenio en el resto de los tratamientos. Se realizaron dos réplicas por cada condición experimental.



Figura 3.1. Depósitos para la decantación y almacenaje del agua de mar para los cultivos.

Los ensayos preliminares de acumulación se llevaron a cabo en el IFAPA Centro Agua del Pino (El Rompido-Huelva). Las almejas empleadas se distribuyeron en lotes al azar (60 almejas por grupo) y se mantuvieron en tanques de poliéster (40 L) con agua de mar (filtrada por arena y cartucho de 50 μm) en circuito cerrado, aireación continua y renovación completa diariamente (Figura 3.2).

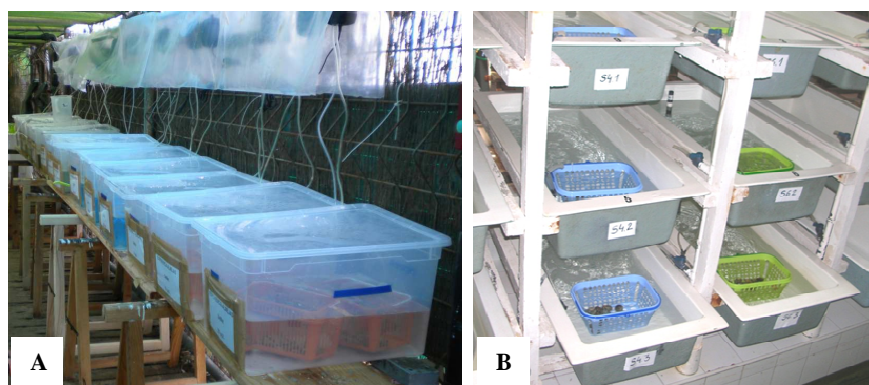


Figura 3.2. Tanques para el cultivo de almeja, A (65 L) y B (40 L)

Durante los experimentos de acumulación se monitorizaron y mantuvieron varios parámetros de calidad del agua en estos rangos: pH 7,18; oxígeno disuelto 95%; nitratos < 14,9 mg L^{-1} , nitritos < 6,8 mg L^{-1} , amonio < 3,8 mg L^{-1} y fosfatos < 1,5 mg L^{-1} (cromatógrafo iónico Metrohm 883 Basic IC plus, Herisau, Suiza). Así mismo, diariamente se retiraban los individuos muertos durante las labores de limpieza y renovación de agua, considerándose almeja muerta aquella que mostraba ausencia del cierre de las valvas en respuesta refleja a un estímulo mecánico cuando las valvas permanecían abiertas (Narváez *et al.*, 2005). Las almejas fueron alimentadas una vez a la semana, coincidiendo con el día de muestreo, con la microalga *Isochrysis galbana* clon T-Iso liofilizada, con una ración equivalente a un 4 % del peso seco de la carne de la almeja. Previamente a su

administración, el alga liofilizada (0,02 g de microalga por almeja) fue homogeneizada y resuspendida y, a continuación, incorporada en los cultivos (Figura 3.3).

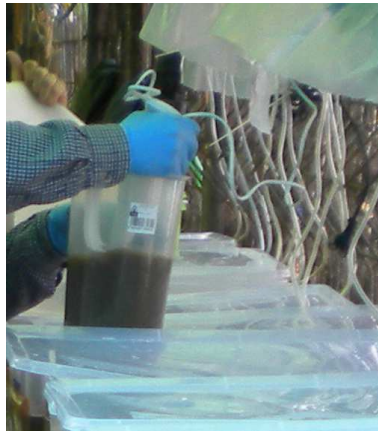


Figura 3.3. Alga liofilizada y resuspendida previamente a su administración.

Por último, en los ensayos de depuración (eliminación), los individuos se situaron en tanques de poliéster (40 L) con sustrato de arena ($\geq 200 \mu\text{m}$) y con agua de mar (filtrada por arena y cartucho de $50 \mu\text{m}$) en circuito abierto (flujo 1 L min^{-1}) y alimentación diaria con una mezcla de microalgas vivas, principalmente las especies *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Tetraselmis suecica*, *Pavlova lutheri*, *Skeletonema costatum* (flujo de 30 ml min^{-1}) (Figura 3.4).



Figura 3.4. Tanques con sustrato de arena para la depuración de las almejas (40 L) en circuito abierto y con alimentación continua.

A continuación se muestran las condiciones de los distintos cultivos experimentales realizados (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Condiciones durante los cultivos experimentales (valores absolutos o media \pm desviación estándar)

Condiciones Experimentales		ENSAYOS		
		Preliminar	Toxificación de Se	Eliminación de Se
Período de los ensayos		Abril-Mayo	Diciembre-Abril	Febrero-Abril
Fotoperíodo natural (horas de luz)		13-14	10-13	11-13
Parámetros medidos al inicio y al final de cada cambio	Temperatura (°C)	19 \pm 1	12 \pm 3	16 \pm 1
	Salinidad (‰)	36	33 \pm 2	36
	pH	8 \pm 0,1	7,18	
	O ₂ disuelto (%)	93 \pm 1	95	
Volumen tanque (L)		45	65	45
Volumen exposición (L)		30	40	30 (Arena); 12 (Lámina superficial de agua)
Talla ind. (mm)		32,51 \pm 2,1	33,40 \pm 2,24	33,56 \pm 2,30
Peso ind. (g)		7,50 \pm 1,76	8,22 \pm 1,67	8,17 \pm 1,63
Nº total almejas / lote		755	2620	96
Nº concentraciones de Se testadas		3	18	4
Nº de replicados		3	2	1
Individuos por tratamiento		60	60	26
Volumen por almeja		0,5	0,5	1-2
Alimentación		4% del peso seco almeja como Tiso liof./semana	4% del peso seco almeja como Tiso liof./semana	Mezcla de microalgas (vivas) en continuo
Aireación		continua	continua	-
Agua de cultivo		Agua de mar decantada y filtrada (arena y 50 μ m)	Agua de mar decantada y filtrada (10 μ m)	Agua de mar decantada y filtrada (arena y 50 μ m)
Sistema de cultivo		Círculo cerrado, renovable (100% en 24h)	Círculo cerrado, renovable (100% en 24h)	Círculo abierto, flujo continuo (1 L min ⁻¹) y sustrato de arena
Duración (días)		21	60-120	60
Variables estudiadas		Mortalidad* Acumulación	Mortalidad Acumulación Estrés	Mortalidad Eliminación Enterramiento

(Mortalidad*: la muerte se determina por ausencia del cierre de las valvas ante el estímulo mecánico; ind.: individuo; liof.: liofilizada)

3.1.1.2. Acumulación de selenio

➤ *Exposición al Se a través del medio acuático (vía agua)*

Se realizó un ensayo preliminar para analizar la capacidad de la almeja fina para acumular selenio, así como el efecto en su mortalidad. Se estudiaron dos especies de selenio inorgánicas, selenito y selenato, disueltas en agua, ($500 \mu\text{g Se L}^{-1}$), y se mantuvo un tratamiento control sin adición de selenio (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Especies de selenio y concentraciones en el ensayo preliminar

Especies de Se		Concentración nominal ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)
Control	Sin selenio	-
Se inorgánico	Selenito de sodio - Se(IV)	500
	Selenato - Se(VI)	500

El experimento se realizó en circuito cerrado con renovación del agua del 100% diariamente, con las condiciones de cultivo expuestas en el *Tabla 3.1* de este capítulo, y con tres réplicas por cada tratamiento.

A partir de este ensayo preliminar se diseñaron los experimentos de acumulación vía agua, decidiendo, en base a los resultados obtenidos (ver *Capítulo 4. - Ensayos preliminares*), las concentraciones de las especies de selenio a utilizar, así como retirar del estudio el Se(VI) y añadir la selenometilselenocisteína (SeMetSeCys).

La concentración media de selenio en el agua de mar se estima $<1 \mu\text{g L}^{-1}$ en ausencia de fuentes directas de Se (Cutter y Bruland, 1984), y se sitúan habitualmente en el rango de $1-10 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas bajo el impacto de alguna fuente externa (geogénica o antropogénica), aunque ocasionalmente puede exceder los $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e incluso alcanzar, en efluentes industriales, y en circunstancias excepcionales, $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ralston *et al.*, 2008). En base a estas concentraciones que se pueden encontrar en el medio natural, se seleccionaron dos dosis de selenio ambiental, 5 y $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para incorporarlas a los experimentos de acumulación a través del medio acuático con selenito, y además, realizar sobre ellas un estudio más amplio de estrés oxidativo.

Las características de los distintos tratamientos utilizados en los experimentos se exponen a continuación (Tabla 3.3):

Tabla 3.3. Especies de selenio y concentraciones en el ensayo de toxicidad

Especies de Se		Concentración nominal de Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Control	Sin selenio	0
Se inorgánico	Selenito de sodio - (Se(IV))	5- 20 - 250 - 500- 750 - 1000
Se orgánicas	Selenometionina - (SeMet)	5 - 10 - 25 - 50
	Selenometilselenocisteína - (SeMetSeCys)	5 - 10 - 25

Todos los compuestos químicos y reactivos utilizados para las disoluciones de selenio fueron de la mayor pureza disponible en el mercado (ver *Apartado 3.5.1*).

La adición del selenio se realizó partiendo de disoluciones acuosas (stocks), preparadas según el *Apartado 3.5.1*, a partir de reactivos sólidos disueltos en un volumen de agua Milli-Q. Se prepararon, a partir de esta disolución, otras intermedias para obtener concentraciones en las que siempre hubiera que añadir 10 ml de la disolución al agua de mar de los tanques para obtener las concentraciones finales de cultivo ($250\text{-}1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$ para Se(IV), $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ para Se(VI), $5\text{-}50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ para SeMet y $5\text{-}25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ para SeMetSeCys).

➤ ***Exposición al Se a través de la dieta (vía alimento)***

La microalga utilizada como alimento fue *Isochrysis galbana* clon T-Iso liofilizada.

Se realizó un ensayo preliminar para estudiar la acumulación de selenio por *Isochrysis galbana* clon T-Iso a partir de dos especies inorgánicas, selenito y selenato. Se realizó el ensayo en erlenmeyers de 2 litros utilizando 1,5 L agua de mar esterilizada y se preparó un inóculo de *Isochrysis galbana* clon T-Iso cuatro días antes de comenzar la experiencia. El cultivo se inicio con una adición de 300 ml del inóculo de la microalga en el agua esterilizada, medio nutritivo F/2 (Guillard, 1975), y alícuotas de distintas disoluciones de selenio. Se contrastaron dos concentraciones por cada especie de selenio, Se(IV) y Se(VI), 50 y $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ y el control sin selenio. Los cultivos se realizaron con iluminación de luz blanca y temperatura constantes (19 ± 2 °C) y aireación con aporte de CO_2 . La experiencia se realizó por triplicado. Se tomaron alícuotas para el control de la densidad microalgal y de la concentración de selenio inicial en el agua en cada uno de los erlenmeyers, este último se

centrifugó y el agua se analizó por ICP-MS). Posteriormente, se tomó una muestra a los cuatro y a los ocho días para determinar el selenio en el agua y contar el número de células. El experimento finalizó a los ocho días, se centrifugó el agua para recoger todas las microalgas. Se congelaron a -80°C y se liofilizó, determinándose en las distintas muestras el selenio total y la especiación de los compuestos de selenio.

A partir de los resultados obtenidos se encargó la producción de alga, tanto enriquecida con selenio (500 µg L⁻¹ de selenito) como sin enriquecer, así como su liofilización, a la empresa Fitoplancton Marino S.L. (Cádiz). Al analizar los niveles de selenio en las microalgas elaboradas por esta empresa obtuvimos 1,033 µg Se g⁻¹ alga liofilizada y 109,247 µg Se g⁻¹ alga enriquecida liofilizada.

Los tratamientos consistieron en diferentes porcentajes de alga enriquecida con selenio en la dieta de las almejas durante 60 días. En la siguiente tabla se muestran las dietas empleadas (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Dietas con *Isochrysis galbana* clon T-Iso enriquecida con selenio

Fuente de selenio	% de alga enriquecida en la dieta
<i>Isochrysis galbana</i> clon T-Iso enriquecida con Se (Se-Tiso)	0 - 25 - 50 - 75 - 100

➤ *Protocolo de exposición*

El procedimiento consistía en renovar diariamente el medio de cultivo con agua de mar limpia previa a la limpieza de los tanques, así como restablecer de nuevo las condiciones experimentales en cada tratamiento para mantener unas concentraciones del metal relativamente constantes.

Periodicidad de las condiciones de toxicidad

En los experimentos de exposición a través del agua, las almejas fueron sometidas a las concentraciones de selenio durante periodos de 6 días consecutivos sin alimentación, tras los cuales tuvieron un día de reposo sin selenio y con alimentación normal.

En los experimentos de exposición a través del alimento, a las almejas se les suministró diariamente la microalga enriquecida con selenio.

3.1.1.3. Eliminación del selenio (depuración)

De cada especie de selenio utilizada en el ensayo de acumulación, a los 60 días de exposición, se trasladaron los individuos de una de sus concentraciones (Tiso 100; Se(IV) 500; SeMet 10; SeMetSeCys 5) a un sistema de flujo abierto con sustrato de arena para estudiar la eliminación del selenio, manteniéndolas en este sistema durante un mes bajo las condiciones que se muestran en la *Tabla 3.1*.

3.2. METODOLOGÍA DE MUESTREO

3.2.1. PERIODICIDAD

Se realizó un muestreo inicial de las almejas antes de comenzar el ensayo y, posteriormente, de cada tratamiento y según el estudio a realizar, los siguientes muestreos:

- Acumulación de selenio: 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 60 y/o 120 días de exposición
- Estudio enzimático: 0, 7, 14, 30, 45 y/o 60 días de exposición
- Estudio tasas de aclaramiento: 0, 7, 14, 28, 60 y/o 120 días de exposición
- Estudio subcelular: 0, 14, 21, 30 y/o 60 días de exposición
(Tiso 100, Se(IV) 500, SeMet 10 y SeMetSeCys 10)
- Depuración del selenio: 0, 4, 7, 14, 30 y/o 60 días desde el inicio de la eliminación
(Tiso 100; Se(IV) 500; SeMet 10; SeMetSeCys 5)

3.2.2. VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EN EL CULTIVO

En los cultivos de acumulación, para evitar la posible influencia de la disminución de la densidad de almejas tras los muestreos, se fue manteniendo el volumen de agua y la alimentación por almeja constante, es decir, se fue reduciendo el volumen de agua y la cantidad de alimento total a lo largo de los muestreos.

3.2.3. ACUMULACIÓN Y ELIMINACIÓN (DEPURACIÓN)

3.2.3.1. Agua de cultivo

En el experimento de acumulación se midieron las concentraciones iniciales y finales de selenio en el agua en cada renovación para determinar el nivel de exposición, realizando cada medida por triplicado.

3.2.3.2. Almejas

En el experimento de acumulación, en cada muestreo se cogieron las almejas de cada tratamiento (n=5-15) al azar, se lavaron con agua de mar limpia, y los individuos se midieron (longitud antero-posterior) y pesaron (peso fresco total). En la depuración, las almejas se muestrearon del mismo modo, estando supeditado el número de individuos muestreados a la mortalidad.

Se recogieron dos tipos de muestras de almeja:

➤ *Cuerpo blando completo*

Las almejas (n=4) se abrieron, se escurrió el agua intervalvar sobre un papel absorbente y, posteriormente, se extrajo el cuerpo blando obteniéndose el peso fresco de la concha y el peso fresco del cuerpo. Las valvas se desecharon y la parte blanda completa se congeló individualmente a -20°C hasta su liofilización (Liofilizador LyoAlfa, Telstar®) y posterior análisis.

➤ *Tejidos*

Las almejas (n=4-10) fueron diseccionadas con bisturí y extraído el cuerpo blando, separándose los tejidos en 5 partes: branquias, hepatopáncreas, manto, pie y resto de vísceras (Figura 3.5), manteniendo durante todo el proceso de muestreo los individuos y las muestras en frío (baño con hielo picado). Se pesaron estos órganos individualmente y se congelaron en tubos Eppendorf a -80 °C hasta su liofilización (excepto las muestras necesarias para los estudios enzimáticos y subcelular) y posterior análisis.

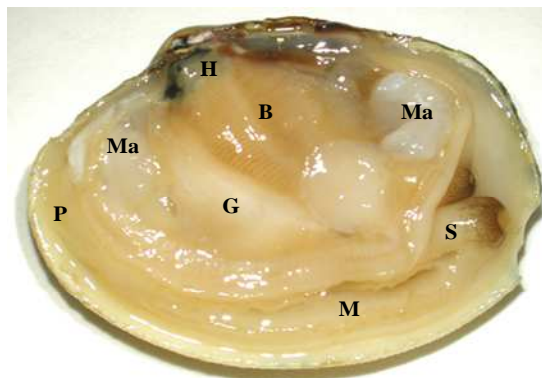


Figura 3.5. Anatomía interna de la almeja fina *Ruditapes decussatus*, vista lateral sin la valva derecha (B: branquia; G: gónada; H: hepatopáncreas; M: Manto; Ma: músculo aductor; P: Pie; S: sifones)

3.3. PARÁMETROS ESTUDIADOS

3.3.1. ACUMULACIÓN Y ELIMINACIÓN DE SELENIO

3.3.1.1. Selenio total

Determinación del selenio total en el medio de cultivo, en el alimento (microalga *Isochrysis galbana* clon T-Iso) y en las almejas, tanto en el cuerpo completo como en los tejidos de las almejas diseccionadas y a nivel subcelular.

Una vez realizada la determinación de selenio, se comparó la concentración en el cuerpo completo con la suma de las concentraciones en los distintos órganos de las almejas, no detectándose diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.8$) en ningún caso de los distintos tratamientos. La ecuación usada para dicha suma fue la siguiente:

$$C_{\text{tejido}} = 0,06 \cdot C_{\text{pie}} + 0,56 \cdot C_{\text{manto}} + 0,11 C_{\text{vísceras}} + 0,17 C_{\text{branquias}} + 0,08 C_{\text{hepatopáncreas}}$$

Siendo los coeficientes, la proporción (tanto por uno) de cada tejido sobre el total de la almeja, los cuales fueron obtenidos a partir de los muestreos biométricos realizados a las almejas a lo largo de todos los ensayos, en los cuales se determinó el peso del cuerpo completo de la almeja y el peso de cada uno de los tejidos (peso húmedo y peso seco), y las C_{tejido} , C_{pie} , C_{manto} , $C_{\text{vísceras}}$, $C_{\text{branquias}}$, $C_{\text{hepatopáncreas}}$, son las concentraciones de selenio expresado en mg Se Kg^{-1} en base seca.

Además, en cada especie de selenio incorporada a través del medio acuático o de la dieta, se correlacionó la concentración de selenio en las almejas respecto a la concentración del

selenio en el medio de cultivo respecto al tiempo final de la dosis que primero alcanza el 100% de mortalidad.

3.3.1.2. Especies de selenio

Determinación de compuestos de selenio en el alimento (microalga *Isochrysis galbana* clon T-Iso), y en las almejas: en el cuerpo completo, en los tejidos de las almejas diseccionadas y a nivel subcelular.

3.3.1.3. Cinética de acumulación y depuración de selenio

➤ *Bioconcentración de selenio desde el agua*

Se aplicó un modelo cinético de primer orden de dos compartimentos a los datos de acumulación de selenio por la almeja (Luoma y Rainbow, 2005), en los que la bioacumulación de selenio en la almeja (individuo completo u órgano (C_{org}), $mg\ Kg^{-1}$) se expresó, teniendo en cuenta que la concentración de Se en el agua (C_w , $mg\ L^{-1}$) de exposición se mantuvo constante durante el periodo de exposición y que la concentración en la almeja en $t=0$ es cero, como:

$$C_{org} = \left(\frac{k_1}{k_2} \right) \cdot C_w \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$

k_1 es la constante de la velocidad de absorción del selenio desde el agua ($L\ Kg^{-1}\ día^{-1}$) y k_2 es la constante de la velocidad de eliminación del organismo ($día^{-1}$). Tanto k_1 como k_2 se estimaron mediante análisis de regresión no lineal con el método de cálculo simplex y cuasi-Newton. Cuando se alcanza el estado estacionario, ambas concentraciones serán constantes durante el tiempo de exposición y se alcanza el equilibrio, entonces se puede calcular el factor de bioconcentración (BCF) como k_1/k_2 .

Se utilizó una prueba t de comparación simple ($p < 0,05$) para comparar las constantes de tasa de absorción y tasa de eliminación. Se usó una regresión lineal para analizar la relación entre la concentración de selenio en las almejas y el tiempo de exposición

➤ *Bioconcentración de selenio desde la dieta*

La acumulación de selenio por la almeja a partir de la dieta se puede describir con una cinética de primer orden (Reinfelder *et al.*, 1998; Wang, 2002; Conover, 1966):

$$dC_{org}/dt = (AE \cdot IR \cdot C_{food}) - (k_e + g) \cdot C_{org}$$

Donde C_{org} es la concentración de selenio en el cuerpo de la almeja ($\mu\text{g g}^{-1}$, en peso seco), t es el tiempo de exposición (días), C_{food} concentración de selenio en el alimento ($\mu\text{g g}^{-1}$), AE es la eficiencia de absorción (%),

$$AE = \left[\frac{C_{food} - C_{heces}}{(1 - C_{heces}) \times C_{food}} \right] \times 100$$

IR ($\text{g día}^{-1} \text{g}^{-1}$) es la relación de la ingesta calculada como la relación de clarificación multiplicada por la concentración del alimento, K_e es la constante de depuración (día^{-1}) y g es la tasa de crecimiento (día^{-1}). C_{heces} , es la concentración del tóxico retenida en las heces

En el estado estacionario obtendríamos el factor de transferencia trófica (TTF):

$$TTF = \frac{IR \cdot AE}{[k_e + g]}$$

➤ *Depuración del selenio*

La depuración se ajustó a un modelo exponencial de un solo componente (1), donde la concentración del agua es cero ($C_w=0$), descrito por la ecuación:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_2 t} \tag{1}$$

Donde C_t y C_0 son las concentraciones de Se (mg Se Kg^{-1}) en el tiempo t y 0 de la depuración, respectivamente, y k_2 es la constante de la velocidad de depuración. El valor de k_d se determinó mediante una regresión lineal de mínimos cuadrados de $\ln C$ frente a t , y se puede calcular la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) a partir de:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2}$$

O a un modelo exponencial de doble componente (2), descrito por la ecuación:

$$C_t = C_{0s} \cdot e^{(-K_{es} \cdot t)} + C_{0l} \cdot e^{(-K_{el} \cdot t)} \tag{2}$$

Donde C_{0s} y C_{0l} son las concentraciones de Se (mg Se Kg^{-1}) a tiempo cero para una compe de vida media corta (s) y una de vida media larga (l), and k_e es la constante de velocidad de depuración biológica (día^{-1}).

3.3.2. MORTALIDAD

Se registró la mortalidad tanto en los cultivos de acumulación como en los de eliminación, considerándose almeja muerta, aquella que mostró ausencia del cierre de las valvas en respuesta refleja a un estímulo mecánico. Los individuos muertos fueron contados y retirados de los tanques inmediatamente.

3.3.3. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Para evaluar la condición fisiológica de las almejas durante el experimento de acumulación, se realizaron las mediciones de los siguientes parámetros:

3.3.3.1. Tasa de aclaramiento

La tasa de aclaramiento (TA) es el volumen de agua que limpia de partículas una almeja por unidad de tiempo (Gosling, 2002).

La tasa de aclaramiento se cuantificó a los 0, 7, 14, 28 y 60 días de exposición colocando dos grupos de 10 almejas en vasos de plástico de 5 litros, que contenían agua de mar aireada y $36 \text{ células } \mu\text{L}^{-1}$ de *Isochrysis galbana*, una baja concentración de algas para impedir la producción de pseudoheces (Foster-Smith, 1975). Un recipiente sin almejas actuaba como un control, para corregir el error por división celular del fitoplancton. A partir de los 15 minutos, se tomaron 10 ml de agua de mar a intervalos de 30 minutos durante 3 h de cada tanque, tomando 3 réplicas de cada lote.

El agua se analizó en un contador de partículas (Coulter Counter Multisizer III, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) equipado con un tubo de abertura de $100 \mu\text{m}$ y ajustado para contar partículas entre $2,5$ y $6 \mu\text{m}$ de diámetro. La tasa de aclaramiento ($\text{TA, L h}^{-1} \text{ animal}^{-1}$) se calculó mediante la ecuación (Coughlan, 1969):

$$\text{CR} = (V / t \cdot n) \cdot \ln (C_1 / C_2)$$

Donde V es el volumen del agua (5 L), n el número de almejas (10), t el intervalo de tiempo (0,5 h), C_1 y C_2 la densidad celular corresponde a la concentración inicial y al final de cada incremento de tiempo, respectivamente. Cualquier pequeño cambio en las concentraciones celulares del control, debido a la división celular o sedimentación, se restan de las tasas experimentales.

3.3.3.2. Actividad enzimática

Las concentraciones de proteínas, sustratos y actividades de enzimas relacionados con el estrés oxidativo en tejidos de almeja se llevaron a cabo mediante espectrofotometría con kits comerciales adaptados a moluscos y a microplacas, según lo descrito por Torres *et al.* (2002) y Bebianno y Barreira (2009). Fueron medidas las actividades enzimáticas de la glutatión S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18), glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y glutatión peroxidasa Se-dependiente (Se-GPx); la peroxidación lipídica (LPO); y las concentraciones de glutatión reducido (GSSG), glutatión oxidado (GSH) y proteínas totales.

Para la determinación espectrofotométrica de todos estos parámetros se usaron microplacas de 96 pocillos con fondo plano (VWR International, USA) y un lector de placas Tecan Sunrise (TECAN, Salzburgo, Austria,) con el software específico Magellan v2.5 para Windows.

➤ *Preparación de los extractos*

Homogeneizado para enzimas GST, GPx y GPx-Se

El hepatopáncreas y la branquia de almeja se homogenizaron con sonda de ultrasonidos (VibraCell VC-300, Sonics & Materials Inc., Newtown (CT), USA), a partir de 2 individuos (140-600 mg de hepatopáncreas y 370-1260 mg de branquia), en frío (0-4 °C), a una relación 1:4 masa del pool de tejido/volumen de “buffer” de extracción.

El “buffer” de extracción para las preparaciones enzimáticas estuvo compuesto de Tris-HCl (hidroximetilamina) 20 mM (Prolabo, 55), EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) 1 mM (Sigma ED2SS), sucrosa 0,5 mM (Fluka 84100), KCl (cloruro de potasio) 0,15 M (Sigma P5405), DDT (ditiotreitól) 1 mM (Sigma D0632), enrasado a 100 mL con agua Milli-Q.

El homogenizado resultante fue centrifugado inicialmente a 500 g durante 15 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5415R, Eppendorf Ibérica, Madrid). El sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 1200 g durante 45 minutos a 4 °C. El sobrenadante final fue la muestra a analizar.

Homogeneizado para LPO y proteínas:

El hepatopáncreas y la branquia de la almeja se homogenizaron, individualmente (20-130 mg), en frío (0-4 °C), a una relación 1/10 masa de tejido/volumen de PBS 100 mM (PBS tablets, Gibco, Life Technologies, CA, USA) y se añadió la disolución antioxidante (0,5 M) a una relación 10:1 masa de tejido/volumen de antioxidante. Posteriormente, se centrifugó a 3000 g, 10 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada. El sobrenadante final se utilizó para medir tanto proteínas como LPO.

La disolución antioxidante (0,5 M) estuvo compuesta por una mezcla de BHT (Sigma 1378) y acetonitrilo (Sigma 34967) (1:11, m/v), que se centrifugó a 3000 g, 3 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada para evitar pipetear el precipitado.

➤ *Análisis enzimáticos*

Glutación peroxidasa (c-GPx, EC 1.11.1.9).

La actividad enzimática se determinó mediante un Kit Bioxytech GPx-340, que realiza una medida indirecta de la actividad de c-GPx. El glutati3n oxidado (GSSG), producido por reducci3n de un per3xido org3nico por c-GPx, es restituido a su estado reducido por la enzima glutati3n reductasa (GR). La oxidaci3n de NADPH a NADP⁺ est3 acompa3ada de una disminuci3n de la absorbancia a 340 nm (coeficiente de extinci3n 6220 M⁻¹ cm⁻¹), proporcionando un medio espectrofotom3trico para monitorizar la actividad de la enzima GPx.

Se utiliz3 un kit de control (Bioxytech Cellular Glutathione Peroxidase Control), que permiti3 evaluar el rendimiento del ensayo, evaluar la recuperaci3n de la actividad enzim3tica en las muestras y normalizar la actividad medida con GPx. Realiz3ndose un est3ndar paralelo a las muestras con el control-GPx diluido en TRIS-HCl y EDTA.

Para el ensayo c-GPx, se añade el homogeneizado del tejido (15 μL) a una disolución que contiene glutatión, glutatión reductasa y NADPH. La reacción enzimática se inicia añadiendo el sustrato, hidroperóxido de terc-butilo, y se registra la absorbancia a 340 durante 3 minutos, cada 30 segundos (la tasa de disminución de absorbancia 340 nm es directamente proporcional a la actividad GPx en la muestra). Posteriormente, y tras calcular la tasa neta de la muestra sustrayéndole la tasa observada para un blanco (agua), se transforman los resultados $A_{340} \text{ min}^{-1}$ de la muestra en NADPH consumido ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) usando la siguiente relación: $1 \text{ mU/mL} = 1 \text{ nmol NADPH min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = (A_{340} \text{ min}^{-1}) 0,00622^{-1}$.

Los resultados fueron expresados en unidades de actividad en la muestra original por ml (mU mL^{-1}). El rango de ensayo con este protocolo es 0,035 a 0,15 $A_{340} \text{ min}^{-1}$, esto corresponde a aproximadamente 5,6 a 24 mU mL^{-1} de actividad enzimática.

Glutatión peroxidasa-Se (c-GPx, EC 1.11.1.9)

La actividad se determinó con los mismo kits y protocolos que en la GPx, pero utilizando un nuevo sustrato: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 65 mM (Sigma P-5655); azida de sodio (NaN_3) 1 mM (Sigma S-8032); peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 2 mM (Sigma S-216763) y agua Milli-Q. Por lo tanto, en el ensayo c-GPx, se añade el homogeneizado del tejido (15 μL) a una disolución que contiene glutatión, glutatión reductasa y NADPH, y la reacción enzimática se inicia añadiendo el nuevo sustrato para GPx-Se y se registra la absorbancia a 340 durante 3 minutos, cada 30 segundos.

Glutatión-S-Transferasa (GST, EC 2.5.1.18)

La reacción catalizada por GST entre GSH y el sustrato de GST, CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) produce un dinitrofenil tioéter que puede detectarse por espectrofotometría a 340 nm, por lo que la actividad enzimática se determinó siguiendo el descenso de la concentración de este complejo GS-DNB (el coeficiente de extinción de GS-DNB a 340 nm es $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), por medio del kit *BioVision GST Colorimetric Assay*.

La mezcla en la microplaca (en la misma proporción) fue un control positivo de GST, un control negativo (tampón de ensayo GST), homogeneizado-muestra (50 μL), glutatión (GSH tamponado) y sustrato CDNB tamponado con dimetil sulfóxido (DMSO) (1:9, v/v).

Se realizó la lectura a 340 nm cada minuto durante 5 minutos (el límite de detección del kit empleado fue 1 mU mg^{-1}).

Peroxidación lipídica (LPO)

La peroxidación de lípidos se estimó con el kit Bioxytech LPO-586, que se basa en la reacción de un reactivo cromógeno, N-metil-2-fenilindol (1), con malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos a 45°C . Una molécula de MDA o 4-hidroxi-alquenos reacciona con 2 moléculas del cromógeno (1) para producir un cromóforo estable con absorbancia máxima a 586 nm.

Se preparó una disolución de malondialdehído como acetal (TMOP) ($20 \mu\text{M}$), ya que el malondialdehído no es estable, y esta forma acetal puede hidrolizarse durante la etapa de incubación ácida a 45°C , generando MDA. A partir de esta disolución, se prepararon las concentraciones para realizar una curva estándar.

Se prepararon además dos reactivos necesarios para este procedimiento: Reactivo 1 (R1), una mezcla de N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo y metanol (3:1, v/v); y Reactivo 2 (R2): ácido metanosulfónico $15,4 \text{ M}$.

A una alícuota del homogeneizado de la muestra ($60 \mu\text{L}$) se le añadió R1 ($195 \mu\text{L}$) y R2 ($45 \mu\text{L}$), se agitó e incubó a 45°C durante 60 min. Posteriormente, estas muestras turbias se centrifugaron para obtener un sobrenadante claro (15000 g , 10 min a temperatura ambiente). Los sobrenadantes finales se transfirieron a la celda de la microplaca para su medición a 586 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto y con los estándares (6 por duplicado). Los resultados son expresados en nmol de MDA por mg de proteínas (el límite de detección del kit empleado fue $0,1 \text{ nM mL}^{-1}$).

➤ ***Determinación de proteínas totales***

Ya que algunas actividades enzimáticas se determinaron respecto a la concentración de proteínas en tejido, se realizó la cuantificación de proteínas mediante el kit de proteínas QCA Total Protein Kit (QCA Analytics, Barcelona), basado en el método desarrollado por Peters (1968), con albúmina de suero bovino como estándar. Este procedimiento se basa en que en disolución alcalina, las proteínas forman con los iones Cu^{++} (reactivo de Biuret) un

complejo coloreado, de gran estabilidad (mínimo 3 horas) y cuantificable espectrofotométricamente.

A una alícuota del homogeneizado de la muestra (20 µL) se le añadió el reactivo de Biuret que incluye el kit (1 mL), y además se añadió un blanco (1 mL del reactivo de Biuret) en la microplaca y un estándar (1 mL del reactivo de Biuret y 20 µL del estándar del kit), se agitó y se mantuvo 10 min a temperatura ambiente (20-25 °C), realizándose posteriormente la lectura a 540 nm.

3.3.3.3. Enterramiento

La tasa de enterramiento (TE50) es el tiempo efectivo requerido para que el 50% de la población testada se haya enterrado completamente. El ensayo se realizó durante el experimento de eliminación de selenio (depuración), se colocaron los individuos en la superficie del sedimento y el número de almejas enterradas se registró durante 0-8 h a intervalos de 60 min y, posteriormente, a las 12, 24, 36 y 48 h. Después este registro se realizó diariamente hasta el final del ensayo.

3.4. PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN SUBCELULAR

La distribución subcelular de los tejidos se examinó en branquias y hepatopáncreas usando un procedimiento adaptado de Taylor y Maher (2012b). Los tejidos diseccionados se colocaron en viales de polipropileno, se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Previamente al procesado de las muestras se realizó un ensayo para establecer un medio homogeneizador adecuado para llevar a cabo la separación subcelular, ensayándolo tanto en branquias como en hepatopáncreas. Para ello, se realizó una prueba con almejas cultivadas con 50 µg Se L⁻¹ de SeMet durante siete días y distintos medios homogeneizadores descritos por Bonneris *et al.* (2005), Solokova *et al.* (2005) y Taylor y Maher (2012 b): Hepes con inhibidor de proteínas, Hepes sin inhibidor de proteínas y Tris-HCl, siendo Hepes y Tris disoluciones tampón (Sigma-Aldrich), en una relación 1:5 para todos y para Tris-HCl se utilizó además una relación 1:2.

Una vez realizada la separación subcelular, siguiendo el procedimiento de Taylor y Maher (2012 b) descrito más adelante, se determinó en las fracciones de las mitocondrias y los lisosomas, tanto la actividad enzimática del ácido fosfatasa (CS0740, Sigma-Aldrich) como del citocromo c oxidasa (kits Citocromo c oxidasa CYTOCOX1, Sigma), que residen en los lisosomas y en las membranas mitocondriales, respectivamente.

Posteriormente, a las fracciones obtenidas y a una muestra de las almejas (cuerpo completo liofilizado), se les realizó la especiación y la determinación de la concentración de SeMet, mediante hidrólisis enzimática, derivatización y SBSE-TD-GC-MS (ver en *Apartado 3.5.2.1*), para ver si afectaba el medio homogeneizador a los resultados de la especiación de selenio,

Además, se realizó un ensayo tomando como variables distintos tiempos y revoluciones en la ultracentrifugación (15 y 30 min a 5650 rpm; 15 y 30 min a 11300 rpm), a partir de almejas homogeneizadas con Hepes con inhibidor de proteasa, con el objetivo de mejorar la separación en la fracción de los lisosomas, ya que habían aparecido mitocondrias en todos los medios homogeneizadores estudiados.

Una vez definido el protocolo de homogeneización, se comenzó el procesado de las muestras. El tejido se descongeló (en baño de hielo) y se cortó con tijeras en trozos pequeños. Se pesaron, aproximadamente $0,35 \pm 0,09$ g de branquia y $0,16 \pm 0,06$ g de hepatopáncreas (peso húmedo) por muestra, en tampón salino 5 (v/w) de medio homogeneizador con inhibidor de proteasa (30 mM HEPES, 62,5 mM NaCl, 62,5 mM KCl, 250 mM sucrosa, 5mM MgCl₂, 0,1 mM fenilsulfonilfluoruro, 1 mM β-mercaptoetanol enrasado a 100 ml con agua Milli-Q).

Los tejidos se homogeneizaron (en baño de hielo) usando un homogeneizador (IKA® Ultra-turrax-T10, Labortechnik) equipado con una herramienta de dispersión (S10-UT) a 9.500 rpm (Janke & Kunkel, Alemania). El tejido homogeneizado se sometió a centrifugación diferencial de acuerdo con el protocolo que se muestra en la Figura 3.6, utilizando una ultracentrífuga (Optima L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA).

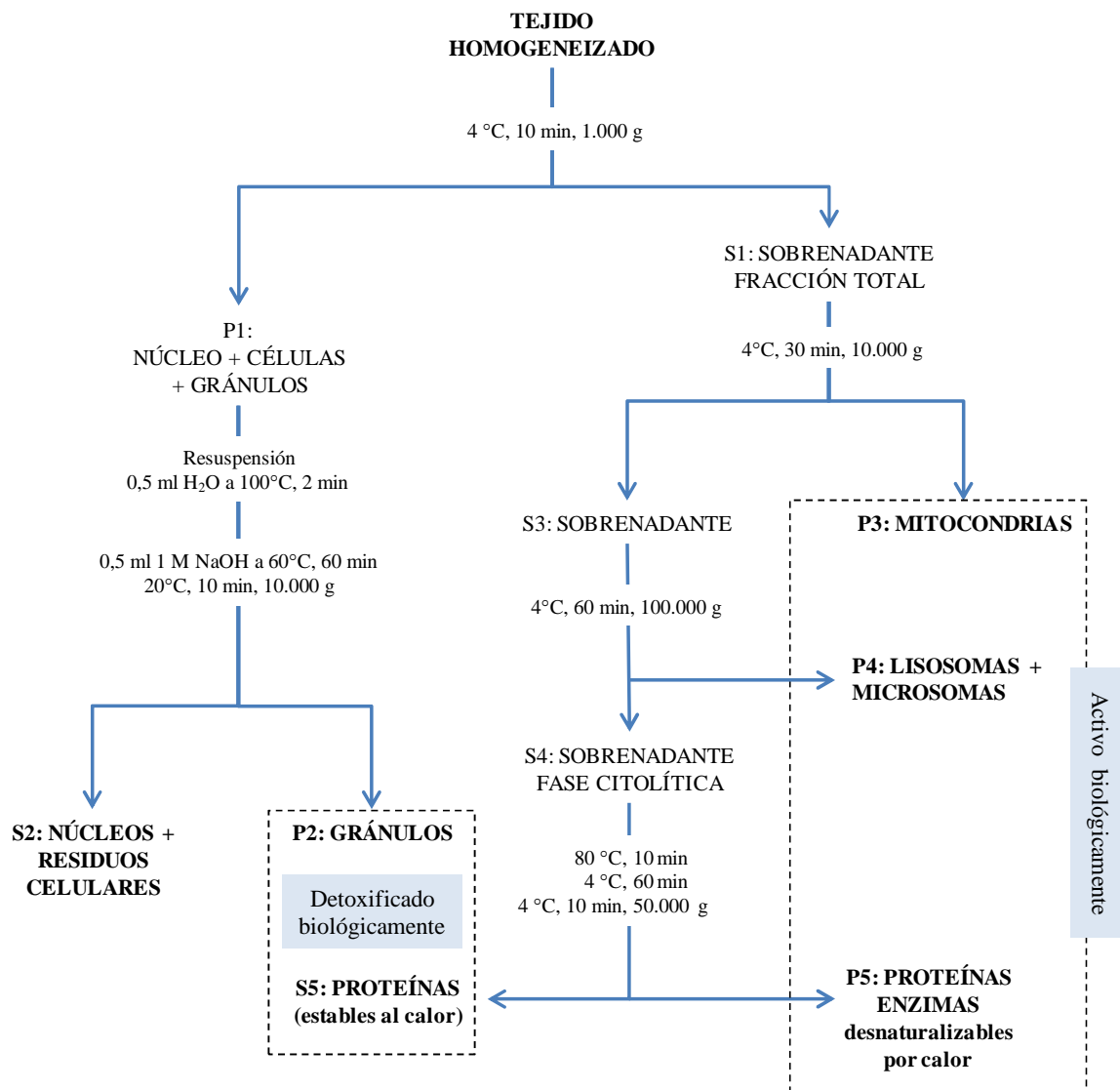


Figura 3.6. Esquema del protocolo de separación subcelular realizado en branquia y hepatopáncreas (modificado de Taylor y Maher (2012 b)).

Se agruparon dos orgánulos y una fracción enzimática (P3, P4 y P5, respectivamente) como fracciones activas biológicamente, mientras que el gránulo, P2, y el sobrenadante final, S5, se agruparon como fracción detoxificada biológicamente. El sobrenadante, S2 quedó conteniendo desechos celulares.

Se determinó el selenio total y la especiación de selenio en todas las fracciones obtenidas en la separación subcelular (P2, P3, P4, P5, S2 y S5).

El estudio de la distribución subcelular se ha realizado en una dosis de cada una de las especies de selenio y a dos tiempos de exposición: Se(IV)-500 (14 y 30 días), SeMet-10 (21 y 30 días), SeCys-10 (30 y 60 días) y Tiso-100 (21 y 30 días).

3.5. ANÁLISIS DEL SELENIO TOTAL Y ESPECIACIÓN

3.5.1. REACTIVOS

Todos los productos químicos y reactivos utilizados fueron de calidad para análisis o de grado HPLC, de los laboratorios Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) o Merck (Darmstadt, Alemania), excepto el etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) y el cloroformo (Cl_3CH) que son de grado pesticida (Romil, Waterbeach, Cambridge, UK).

Las disoluciones se prepararon con agua ultrapura (18,2 M Ω) obtenida mediante un sistema de purificación Elix con un equipo modelo Milli-Q Gradient System (Millipore Bedford, MA, USA).

Las disoluciones patrón de las especies de selenio se prepararon a partir de reactivos sólidos en HCl 0,1 M, 1000 mg Se L⁻¹ de Se(IV) y Se(VI) y 500 mg Se L⁻¹ de SeMet, SeCys y SeMetSeCys. Se prepararon volúmenes de 100 mL de cada una de las disoluciones patrón de selenio, y se almacenaron en botes de polietileno a 4 °C durante 6 meses. Las disoluciones de calibración se prepararon diariamente a partir de las disoluciones patrón.

Lavado y acondicionamiento del material

Todo el material de vidrio y plástico se lavó con agua corriente, posteriormente con detergente alcalino (Derquim, Panreac) y se enjuagó con agua destilada. Después, el material fue sumergido en una solución de HNO₃ al 10% v/v por 24-48 h, enjuagándose a continuación con agua Milli-Q, con el fin de eliminar cualquier interferente y se dejó secar al aire.

3.5.2. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO

3.5.2.1. SBSE-TD-GC-MS: Extracción por absorción sobre barra agitada – termodesorción – cromatografía de gases - espectrometría de masas

Una alícuota (100 μL) de la disolución estándar de selenoaminoácidos o extracto de hidrólisis enzimática (ver en *Apartado 3.5.4*) de muestra se colocó en un vial de 20 mL, añadiendo 400 μL de un mezcla de agua:etanol:piridina (60:32:8) y una cantidad de 40 μL

de etilcloroformiato. Se tapó y se agitó la mezcla vigorosamente durante 60 segundos a temperatura ambiente. Se produjo desprendimiento de gas (dióxido de carbono). Después de la derivatización, la mezcla fue diluida en 1,5 mL de una disolución acuosa de NaCl 70 g L⁻¹, se añadió una barra de agitación recubierta con PDMS 10 mm x 1 mm (Twister) al vial y se tapó con un tapón septum de silicona recubierto de teflón. El proceso SBSE se llevó a cabo a temperatura ambiente (23 ± 1°C) durante 20 min mientras se agitaba a 900 rpm. Después de la extracción, la barra de agitación se extrajo fácilmente con una pinza, se lavó con agua ultrapura, se secó con un paño libre de pelusa, y se colocó dentro de un tubo de vidrio de 6 cm de longitud para proceder a la desorción térmica (TD). El tubo de TD se colocó entonces en el sistema TD, donde la barra de agitación se sometía a desorción térmica en línea acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (TD-GC-MS). El sistema de termodesorción consistió en un TDS 2, equipado con un muestreador inyector automático TDS-A, y un sistema de temperatura de vaporización programable (PTV) CIS 4 de entrada (Gerstel), y acoplado a un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) con un detector de espectrometría de masa (5973 Agilent Technologies).

La temperatura de desorción para el sistema TDS 2 fue programada para aumentar desde 40 °C (durante 1 minuto) a 200 °C, con una velocidad de 60 °C min⁻¹. Los compuestos desorbidos fueron criotrapados a una temperatura de -5 °C, sobre un sistema PTV que consta de un *liner* con lana de cuarzo y dióxido de carbono líquido. El sistema PTV fue programado para incrementar la temperatura desde -5 a 300 °C (operación que duró 10 min a 12 °C s⁻¹) y poder inyectar los compuestos criotrapados dentro de la columna analítica. Una vez que los analitos fueron atrapados por medio del control de la temperatura, la cantidad total de muestra se sometió al análisis mediante GC-MS. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna de sílice fundida HP-5MS (30 m × 0,25 mm, 1 µm de espesor, suministrado por J & W Scientific, Agilent Technologies). La temperatura del horno se programó para aumentar desde 40 a 300 °C con una rampa de 15°C min⁻¹ y se mantuvo durante 10 min. Se utilizó como gas portador helio a un flujo constante de 1 ml min⁻¹.

El espectrómetro de masas fue operado en los modos de control de ion total (TIC) y en el modo de seleccionador de iones (SIM) con ionización electrónica (EI) (voltaje de ionización: 70 eV). Se utilizó un tiempo de análisis de 1,02 s para un rango de masas, m/z = 50-550. El modo SIM se utiliza para la cuantificación con un tiempo de retardo de

disolvente de 4,0 min. Cada compuesto se identificó utilizando tres iones característicos, un cuantificador (m/z 194 y 297, para SeMetSeCys y SeMet derivatizadas, respectivamente) y dos iones calificadores (m/z 210 y 283 para SeMetSeCys derivatizada y m/z 128 y 202 para SeMet derivatizada) y la intensidad relativa del calificador para cuantificar los iones ($\pm 20\%$). Ellos fueron escogidos, de acuerdo con los espectros de masas característicos, obtenidos en modo de barrido completo. Esta prueba, junto con los tiempos de retención (que debe estar dentro de los 3 s de la norma correspondiente), se utiliza para garantizar que se llegó a la asignación correcta de pico en las muestras reales que fueron analizadas. El tiempo de permanencia se optimizó y se seleccionó 100 ms como el adecuado. Las ventanas de tiempo se seleccionaron igual al tiempo total del experimento.

Las características analíticas se muestran en la Tabla 3.5:

Tabla 3.5. Rango lineal, coeficientes de regresión lineal (R), límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), repetitividad y reproducibilidad para SeMetSeCys y SeMet determinadas por el método SBSE-TD-GC-MS (SIM).

Analito	Tiempo (min)	Rango lineal (ng Se)	R	LOD ^a (ng Se)	LOQ ^a (ng Se)	Repetitividad (% RSD; n=5)			Reproducibilidad (%RSD; n=5)		
						20 ng Se	150 ngSe	450 ng Se	20 ng Se	150 ng Se	450 ng Se
SeMetSeCys	10,96	0- 450	0,9997	2,2 (0,4)	7,4 (1,5)	5,1	3,0	5,4	11,8	8,6	12,3
SeMet	13,23	0-450	0,9997	2,8 (0,6)	9,1 (1,8)	6,2	4,3	5,6	12,2	9,0	11,4

^a En paréntesis mg Se Kg⁻¹

3.5.2.2. HPLC-TR- UV-HG-AFS: Cromatografía líquida de alta resolución – termoreducción – ultravioleta - generación de hidruros - espectroscopia de fluorescencia atómica

Para la determinación de las especies de selenio se empleó el acoplamiento instrumental HPLC-UV-TR-HG-AFS, basado en una bomba cuaternaria de cromatografía líquida de alta resolución JASCO 2089-PU Plus (JASCO International Co., Ltd., Hachioji, Tokio, Japón), equipada con válvula de 6 vías modelo 7125 (Rheodyne) y bucle de introducción de muestra de 200 μ L, acoplada a un sistema de termoreducción y generación de hidruro (PS Analytical, Ltd., Kent, Gran Bretaña) y posteriormente a un detector de fluorescencia atómica (PS Analytical, Ltd., Kent, Gran Bretaña) equipado con una super lámpara de

selenio (Photron) como se muestra en la Figura 3.7 Para la adición en continuo de los reactivos se utilizó una bomba peristáltica de 4 vías, Minipuls 3 (Gilson).

Para la separación cromatográfica se emplearon dos tipos de columnas, trabajando en ambas en modo isocrático y empleando las fases móviles indicadas en la Tabla 3.6.

- Columna de intercambio aniónico: *PRP X-100 250 x 4,1 mm, 10 μm* (Hamilton Company, Reno, Estados Unidos).

- Columna de intercambio catiónico: *PRP X-200 250 x 4,1 mm, 10 μm* (Hamilton Company, Reno, Estados Unidos).

Como sistema de termoreducción se empleó el dispositivo Speciation Heated Coil, modelo S570U100 (PS Analytical, Ltd., Kent, Gran Bretaña), que consiste en un bucle de tubo de teflón (3 m de longitud, 0,5 mm d.i.) enrollado sobre bloque calentado eléctricamente y un bucle de tubo de teflón (9 m de longitud, 0,5 mm d.i.) enrollado sobre lámpara de vapor de Hg de 9 W por los que circula la muestra y una disolución de KBr al 5% en HCl 6 M para reducir todas las especies a Se(IV).

La generación de hidruros volátiles se obtiene por un flujo continuo de NaBH₄ 1,2 % (en NaOH 0,4 % (p/v) y se utiliza una corriente de argón como gas de arrastre hacia un separador gas-líquido y, posteriormente, hacia el detector de fluorescencia atómica con una corriente de Ar/H₂. Entre el separador gas-líquido y el detector de fluorescencia atómica, se sitúa una membrana higroscópica (Perma Pure Products) para eliminar los restos de agua de la fase gaseosa. La señal analógica obtenida en el detector se convierte a digital, y esta se trata mediante un software adecuado de integración.

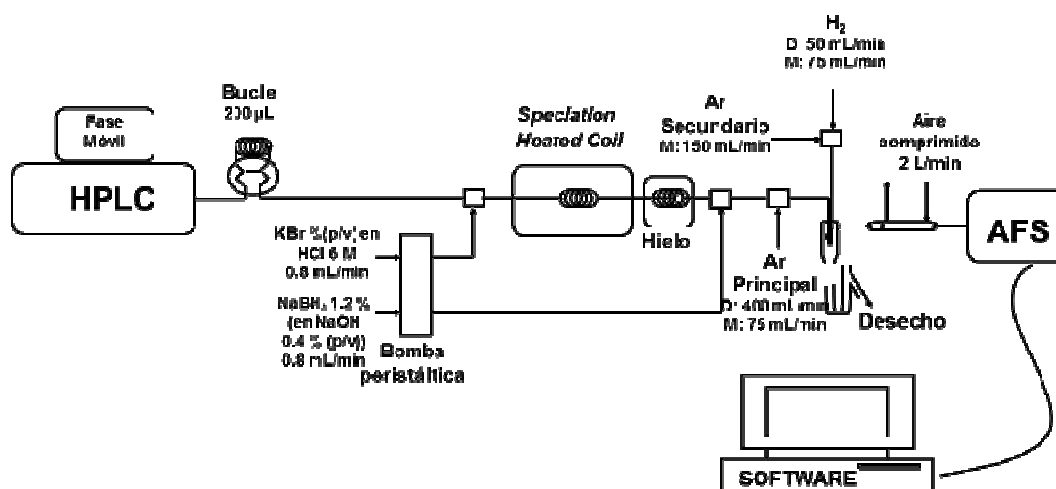


Figura 3.7. Acoplamiento instrumental HPLC-TR-UV-HG-AFS (modificado de Sánchez-Rodas *et al.*, 2013)

En la Tablas 3.6 y 3.7 se resumen, respectivamente, las condiciones y características analíticas del acoplamiento HPLC-TR -UV-HG-AFS para la especiación de selenio.

Tabla 3.6. Condiciones del acoplamiento HPLC-TR-UV-HG-AFS para especiación de selenio.

<i>HPLC</i>		
	<i>Aniónica</i>	<i>Catiónica</i>
Columna	Hamilton PRPX-100 (25 cm x 4,1 mm, 10 µm)	Hamilton PRPX-200 (25 cm x 4,1 mm, 10 µm)
fase móvil	80 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 6	Pyridina 10 mM, pH 1,5
flujo bomba	0,8 mL min ⁻¹	1,0 mL min ⁻¹
volumen de inyección	200 mL	
<i>Termoreducción (TR)</i>		
temperatura	148°C	
bucle de reacción	3 m, 0,5 mm d.i., PTFE	
reductor	KBr 5% (p/v) en HCl 6M	
flujo	0,8 mL min ⁻¹	1,0 mL min ⁻¹
<i>Ultravioleta (UV)</i>		
Temperatura	148°C	
bucle de reacción	9 m, 0,5 mm i.d., PTFE	
reductor	KBr 5% (p/v) en HCl 6M	
flujo	0,8 mL min ⁻¹	1,0 mL min ⁻¹
<i>Generación de hidruros (HG)</i>		
reductor	NaBH ₄ 1,2 % (en NaOH 0,4 % (p/v))	
flujo bomba	0,8 mL min ⁻¹	1,0 mL min ⁻¹
flujo de Argón	400 ml min ⁻¹	
flujo de aire (membrana higroscópica)	2 L min ⁻¹	
<i>AFS</i>		
fuelle de radiación	super lámpara de Se	
corriente 1ª y 2ª	20 mA y 25 mA	
ganancia del detector	100	
longitud de onda de detección	filtro de 190-210 nm	
flujo de Hidrógeno	50 mL min ⁻¹	

Tabla 3.7. Características analíticas del acoplamiento HPLC-TR-UV-HG-AFS para especiación de selenio.

Especie de Se	ecuación recta	R ²	rango lineal (mg Kg ⁻¹)	LD (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)
<i>Intercambio aniónico</i>					
SeCys ₂	y = -70 + 610 x	0,9986	0,04 – 20	0,04	9,5
SeMetSeCys	y = -63 + 616 x	0,9994	0,04 – 16	0,04	6,6
Se(IV)	y = 40 + 1263 x	0,9994	0,02 – 15	0,02	8,4
SeMet	y = -160 + 327	0,9994	0,07 – 40	0,07	5,8
Se(VI)	Y = 16 + 252 x	0,9999	0,09 – 30	0,09	11,9
<i>Intercambio catiónico</i>					
SeCys ₂	y = 112 + 866 x	0,9996	0,10 - 20	0,10	7,2
SeMetSeCys	y = 69 + 196 x	0,9991	0,44 - 92	0,44	12,9
Se(IV)	y = 149 + 2070 x	0,9985	0,02 – 11	0,02	7,1
SeMet	y = -126 + 28x	0,9985	2,5- 320	2,5	8,9
Se(VI)	y = 180 + 406 x	0,9986	0,04 - 30	0,04	7,5

LD: calculado como 3 veces la relación señal/ruido.

RSD: calculada a partir de 4 inyecciones no consecutivas en 10 días.

3.5.2.3. FIA-TR-UV-HG-AFS: Analizador de inyección de flujo -termorreducción-ultravioleta - generación de hidruros - espectroscopia de fluorescencia atómica

Mediante esta técnica se llevó a cabo la determinación de selenio total. Las condiciones de este acoplamiento son similares que en el sistema de acoplamiento anterior (HPLC-TR-UV-HG-AFS), pero sin la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El límite de detección fue $0,4 \text{ mg Se Kg}^{-1}$.

3.5.2.4. ICP-MS: Espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas

La determinación de selenio total se llevó a cabo por espectrometría de plasma con detector de masa (ICP-MS) con celda de colisión (Agilent 7700 ICP-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El plasma de argón se sustentó sobre una antorcha tipo Fassel empleando los flujos de $0,6$; $0,5$; y 15 L min^{-1} para los gases inyector, auxiliar y exterior, respectivamente, y una potencia de $1,9 \text{ kW}$. La muestra se introdujo mediante un nebulizador de flujo cruzado a un flujo de 1 ml min^{-1} . Como gas de reacción se utilizó He a un flujo de $4,3 \text{ ml min}^{-1}$. Los distintos parámetros operativos se ajustaron mediante una disolución de calibración constituida por Li, Y, Ce y Tl para obtener la máxima señal y la mejor precisión. Se empleó una disolución de selenio estandarizada para la preparación de las curvas de calibración. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica del patrón interno, empleando una disolución de Ge. Los isótopos monitorizados fueron m/z 78 y 72 para el Se y Ge, respectivamente. El límite de detección fue $0,03 \text{ mg Se Kg}^{-1}$.

Las condiciones de medida por ICP-MS se muestran en el cuadro siguiente (Figura 3.8):

Condiciones del plasma		Lentes iónicas		Cuadrupolo	
RF power :	1550 W	Extract 1:	0 V	AMU gain:	135
RF matching	1,9 V	Extract 2:	-180 V	AMU offset:	125
Sample depth:	8 mm	Omega bias:	-90 V	Axis gain:	1
Torch-H:	0,6 mm	Omega lens:	7,8 V	Axis offset:	0,2
Carrier gas:	1,18 L/min	Cell entrance:	-70 V	QP bias:	-15 V
Dlution mode:	off	Deflect:	2 V	Detector	
Makeup gas:	0 L/min	Plate bias:	-70 V	Discriminador:	4,5 mV
Optional gas:	0%	Octopolo		Analog HV:	1665 V
Nebulizar pump:	0,1 rps	Octp RF:	170 V	Pulse HV:	1167 V
Sample pump:	2,0 rps			Celda de colisión	
S/C temp	2 °C	Octp bias:	-18 V	Reaction mode:	on
				He gas:	4,3 mL/min

Figura 3.8. Condiciones del ICP-MS para el selenio total

3.5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE SELENIO.

La determinación de selenio total en las muestras de biota se realizó por un proceso de digestión. Se pesaron 0,05 g de muestra liofilizada en un reactor de teflón y se sometieron a digestión ácida añadiendo 2 ml de HNO₃ y calentando en microondas (LG MS-924W/2) a 350 W durante 2 min. Una vez enfriado, se adicionó 1,5 mL de H₂O₂ y se calentó en microondas 2 min. Después de la digestión, se enrasó con agua destilada en un matraz aforado de 5 mL. En este digerido se midió el selenio por ICP-MS o FIA-UV-TR-HG-AFS.

En el sistema FIA-UV-TR-HG-AFS las sensibilidades de Se(VI), SeMet y SeMetSeCys son inferiores a la del Se(IV), pero durante el proceso de digestión de las muestras, las especies de selenio se oxidan a Se(VI), por lo tanto, para este acoplamiento instrumental, el Se(VI) debe transformarse a Se(IV) que es el único que genera hidruro volátil y es detectado por AFS, siendo necesario introducir una etapa que reduzca todas las especies presentes en la digestión a Se(IV). En esta etapa de reducción, se adiciona un volumen equivalente de una disolución de 5% de KBr disuelto en HCl 6 M a un alícuota del extracto ya digerido y se calienta a 95°C durante 90 min en agitador (JP-Selecta MCG05EA). En

este extracto digerido y reducido se midió el selenio total por el sistema FIA-UV-TR-HG-AFS.

Este mismo procedimiento de digestión y reducción se llevó a cabo a un alícuota del residuo y de los extractos generados en la extracción para la especiación de selenio en las muestras de almejas. Posteriormente, todas las muestras obtenidas se conservaron a -20°C.

3.5.4. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO (ESPECIACIÓN)

La extracción de las especies de selenio presentes en las muestras se realizó por medio de hidrólisis enzimáticas. Como enzimas se utilizaron la proteasa XIV, aislada de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, Milwaukee (WI), USA) y la lipasa VII, según el método optimizado para la extracción de las especies de selenio por Mellano *et al.* (2013).

Se pesaron en un vial de 15 mL, 0,05 g de muestra liofilizada, 15 mg de proteasa XIV:lipasa VII (2:1) y 3 mL de agua milli-Q. Posteriormente, se sometieron a la acción de la sonda de ultrasonidos con sonda de titanio de 3 mm de punta (Sonopuls HD 2070, Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin, Alemania), durante 2 minutos, a 50% de potencia y 100% del ciclo de tiempo de encendido, manteniendo durante este proceso la muestra en frío (baño de hielo). Seguidamente, la muestra se centrifugó (Digicen 21-Orto Alresa, Madrid) durante 10 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de Nylon 0,45 µm (Sartorius) para su análisis de especiación por el sistema de acoplamiento HPLC-UV-TR-HG-AFS.

Al residuo generado tras la centrifugación se le añadieron 3 mL de NaOH (0,1 M) y se sometió de nuevo a la acción de la sonda de ultrasonidos, durante 2 minutos a 50% de potencia y 100% del ciclo de tiempo de encendido y manteniendo durante el proceso el residuo en frío (baño de hielo), filtrándose posteriormente a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm para su análisis de especiación por el sistema de acoplamiento HPLC-UV-TR-HG-AFS. Todas las muestras obtenidas se conservaron posteriormente a -20 °C.

En la Figura 3.9 se presenta un esquema del proceso que se le realiza a las muestras para determinar el selenio total y la especiación.

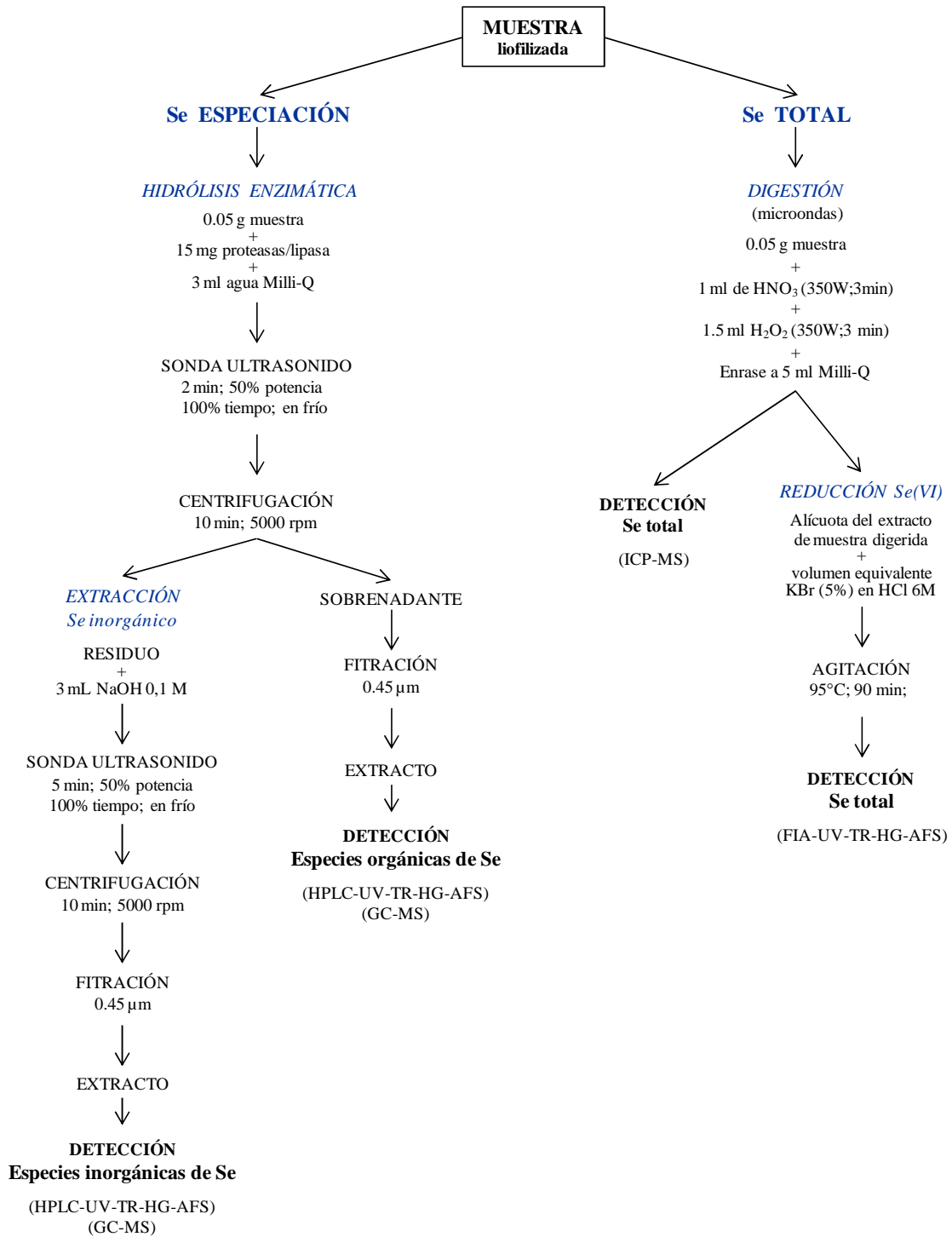


Figura 3.9. Esquema del proceso realizado a las muestras previo a la determinación del selenio total y especiación

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo a través del programa SPSS (versión 13.0) para Windows (SPSS Inc. Chicago).

Se calcularon los estadísticos descriptivos para las variables estudiadas: mortalidad, tasa de aclaramiento, acumulación de selenio, distribución del selenio y actividad enzimática.

Se realizaron estudios de comparación de medias de cada tratamiento con respecto a sus controles y entre todos los tratamientos entre sí, mediante pruebas paramétricas (t-Student y ANOVA de una vía y/o dos vías) y no paramétricas (U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis), y las pruebas post-hoc, test de Tukey y Duncan, previamente se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de la distribución de datos (test de Levene). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Capítulo 4.

RESULTADOS

ENSAYOS PRELIMINARES

❖ Los resultados del ensayo preliminar realizado con almejas expuestas a selenito y selenato ($500 \mu\text{g Se L}^{-1}$), como se detalla en el *Apartado 3.1.1.2.*, mostraron que no había diferencia significativa en la concentración de selenio total en el cuerpo completo de las almejas expuestas a selenato respecto al control (ANOVA, $p=0.206$), mientras que se observó un incremento en la concentración de selenio en el grupo de almejas con presencia de selenito en el medio de cultivo (ANOVA, $p=0.00027$). Por lo tanto, no se utilizó el selenato en los ensayos.

❖ Respecto al ensayo para establecer el protocolo de homogeneización en el proceso de separación subcelular (*Apartado 3.4.*), los resultados de la determinación, en las fracciones de las mitocondrias y los lisosomas, de la actividad enzimática del ácido fosfatasa y del citocromo c oxidasa según el medio homogeneizador utilizado mostraron que la máxima actividad enzimática (citocromo c oxidasa) en la fracción de los mitocondrias aparece con el medio homogeneizador Hepes con inhibidor de proteasa, no apareciendo lisosomas en esta fracción en todos los medios homogeneizadores estudiados (Figura 4.1.a). En cuanto a la fracción de los lisosomas, fue en el medio homogeneizador Hepes con inhibidor de proteasa en el que apareció más actividad enzimática (ácido fosfatasa), pero aparecieron mitocondrias en todos los medios homogeneizadores estudiados (Figura 4.1.b). Así mismo, en la especiación de las fracciones subcelulares de la muestra de $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet de este ensayo, no se obtuvieron diferencias significativas (ANOVA, $p=0.243$) en la concentración de SeMet en las fracciones subcelulares para todos los medios estudiados, por lo que el medio homogeneizador no afectaba a los resultados de la especiación de Se.

En el ensayo para optimizar la separación en la fracción de los lisosomas por medio de variaciones de tiempo y revoluciones de ultracentrifugación, no se obtuvieron resultados positivos, no consiguiéndose mejorar la separación.

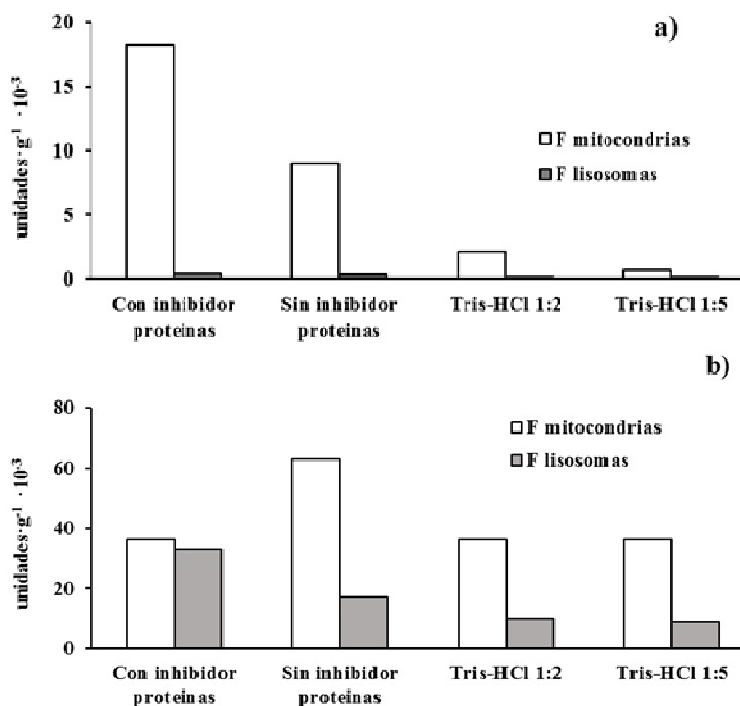


Figura 4.1. Comparación de la separación subcelular en almejas (cultivadas con 50 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet durante siete días) homogeneizadas con diferentes medios: a) Actividad citocromo c oxidasa (unida a membrana mitocondrial); b) actividad del ácido fostatasa (reside en los lisosomas)

Por lo tanto, el proceso de separación subcelular se llevó a cabo con el medio homogeneizador Hepes con inhibidor de proteasa, realizándose la separación subcelular para la determinación de la distribución de selenio según el proceso descrito en Figura 3.6.

❖ El estudio preliminar de enriquecimiento con selenio de la microalga *Isochrysis galbana* clon T-Iso, para utilizarla como alimento en los experimentos, se llevó con selenito y selenato a dos concentraciones (50 y 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$), como se detalla en el Apartado 3.1.1.2. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas en el crecimiento de las microalgas entre los distintos grupos de cultivo con respecto al control (ANOVA, $p=0,247$). Cuando se comparó la concentración de selenio en la biomasa de los distintos grupos de microalgas con respecto al control no se observó diferencias significativas en el grupo de microalgas de selenato (ANOVA, $p=0.166$), mientras que se observó un incremento en la concentración de selenio en la biomasa de microalgas con presencia de selenito (ANOVA, $p=0.00002$), siendo 29 y 38 veces mayor para el grupo de 50 y 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, respectivamente. Por lo tanto, la concentración de selenio en el grupo de microalgas cultivadas en presencia de 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito fue de $17,2 \pm 1,13 \text{ mg Se Kg}^{-1}$ de biomasa en peso seco, de los cuales 3,42 mg Se Kg^{-1} fue SeMet. En

base a los resultados obtenidos en el ensayo se encargó la producción y liofilización de la microalga.

4.1. SELENITO A TRAVES DEL MEDIO ACUÁTICO (VÍA AGUA)

4.1.1. MORTALIDAD

4.1.1.1. Selenito ambiental (5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$)

Respecto a las almejas expuestas a la concentración de selenito ambiental (Se(IV) 5 y 20), la supervivencia fue $\geq 90\%$, no afectando estas dosis de selenito a la supervivencia en periodos de un mes (Figura 4.2).

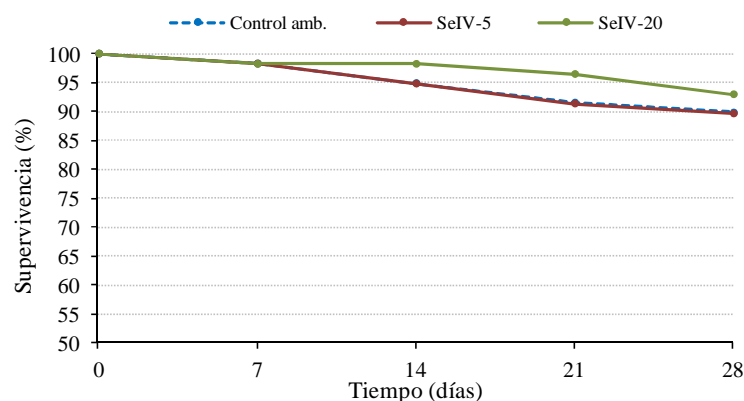


Figura 4.2 Evolución de la supervivencia acumulada en las almejas expuestas a dosis de selenito ambiental a través del agua.

4.1.1.2. Selenito a altas concentraciones (250 - 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$)

En la Figura 4.3 se muestra la supervivencia acumulada de las almejas *R. decussatus* cuando se expone a distintas concentraciones de selenito (250-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), donde se observa que los individuos expuestos a las dos concentraciones más altas, 1000 y 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selenito, sobreviven 28 y 49 días, respectivamente.

Las almejas expuestas a la concentración de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selenito que sobreviven hasta los 60 días, se retiraron del experimento para incorporarlas al ensayo de depuración. El control y los individuos expuestos a la concentración de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selenito sobrevivieron durante todo el periodo de exposición (120 días).

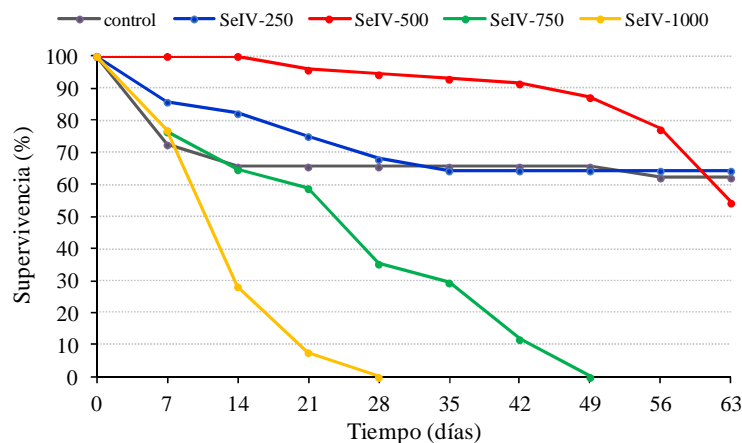


Figura 4.3 Evolución de la supervivencia acumulada en las almejas expuestas a distintas dosis de selenito a través del agua.

4.1.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

4.1.2.1. Tasa de aclaramiento (TA)

Respecto a la tasa de aclaramiento, no se observó diferencia significativa (ANOVA, $p=0,683$) a lo largo del tiempo para el grupo de almejas control, con un valor medio de $0,799 \pm 0,067 \text{ L h}^{-1}$ por almeja (Figura 4.4).

En los lotes expuestos al selenito, los distintos grupos de almejas que no presentaron diferencias significativas respecto al control durante el período de exposición fueron los expuestos a 250 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ (ANOVA, $p \geq 0,683$), en cambio en las almejas expuestas a 500 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p=0,01$; $p=0,001$ respectivamente), presentando estas dosis un efecto claro sobre la tasa de aclaramiento, ya que disminuyó un 37 % y un 58 % a los 60 y 14 días con respecto al control, respectivamente.

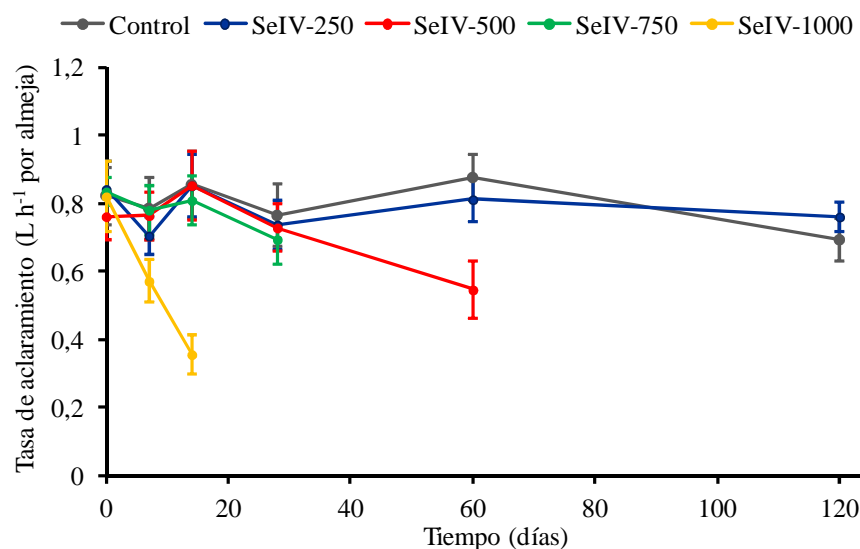


Figura 4.4. Evolución de la tasa de aclaramiento en almejas expuestas a distintas dosis de selenito en el agua durante 120 días

La tasa de aclaramiento que primero se vio afectada por el selenio, ya que disminuye antes que en cualquier otra, es la concentración de $1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, que incluso desciende antes de que comience la mortalidad. Las almejas expuestas a $750 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito mantienen la tasa de aclaramiento alta durante más tiempo, pero comienza la mortalidad antes de que empiece a bajar. En los individuos expuestos a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, la tasa es tan alta como en las almejas expuestas a $750 \mu\text{g Se L}^{-1}$, pero no se mueren y no bajan la tasa de aclaramiento hasta los 60 días, momento en el que comenzó también su mortalidad, pero no tenemos información entre los días 30 y 60, no sabemos si la tasa de aclaramiento empezaría a bajar antes. Las almejas expuestas a $250 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito no se vieron afectadas ni por la mortalidad, ni por este efecto subletal, así como tampoco se apreció en los individuos del control.

4.1.2.2. Actividad enzimática

Para estudiar el estrés oxidativo en el lote de almejas tratadas con selenito se analizaron las alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GPx dependiente de Se y GST, así como el daño oxidativo según el nivel de peroxidación lipídica (LPO).

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática entre ambos tejidos, branquias y hepatopáncreas, durante todo el periodo de exposición, tanto en los individuos tratados como en los controles, siendo para las actividades glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión peroxidasa Se-dependiente (Se-GPx) mayores en las

branquias (ANOVA, $p < 0.020$), y viceversa para la peroxidación lipídica (LPO) (ANOVA, $p < 0.021$) y para la glutatión S-transferasa (GST), esta última para las dosis de selenito ambiental, ya que en dosis elevadas de selenito solo se realizó el estudio en hepatopáncreas, ya que la actividad en branquia estaba por debajo o cercano al límite de detección.

➤ *Selenito ambiental (5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$)*

La actividad GST en branquia estuvo por debajo del límite de detección del kit utilizado para su determinación (1 mU mg^{-1}) en la mayoría de las muestras, por lo que no se pudo realizar el análisis estadístico.

La actividad GPx en el hepatopáncreas se vio reducida significativamente por el selenito y el tiempo de exposición (ANOVA, $p = 0.000$) (Figura 4.5 y Tabla 4.1). A los 8 días de exposición se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p = 0.000$) entre todos los tratamientos incluido el control, pero a los 30 días de exposición las diferencias solo se mantuvieron entre las almejas tratadas con Se y el control, siendo la actividad de la GPx menor significativamente en los individuos tratados con selenio (ANOVA, $p = 0.000$).

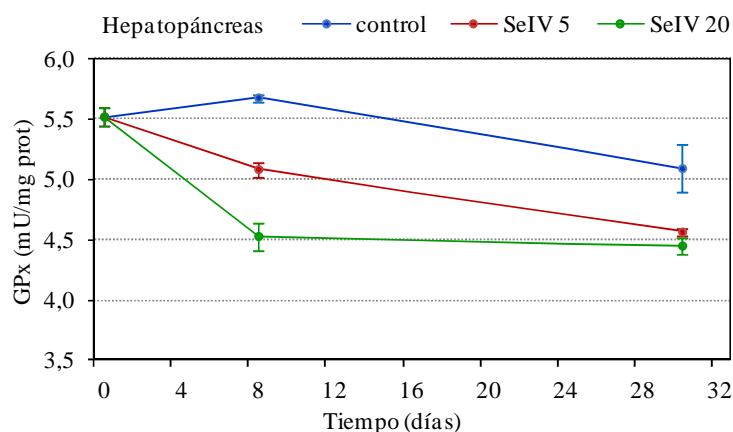


Figura 4.5. Evolución de la actividad GPx (media \pm error estándar; $n = 10$) en el hepatopáncreas en cada una de las dosis del ensayo (control y selenito 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) durante el periodo de exposición

En cambio en branquias, aunque inicialmente (8 días de exposición) hay diferencias significativas en la actividad GPx entre los individuos tratados y el control (ANOVA, $p = 0.011$), al final del período de exposición no se aprecia diferencia significativa entre ellos (ANOVA, $p = 0.549$) (Figura 4.6).

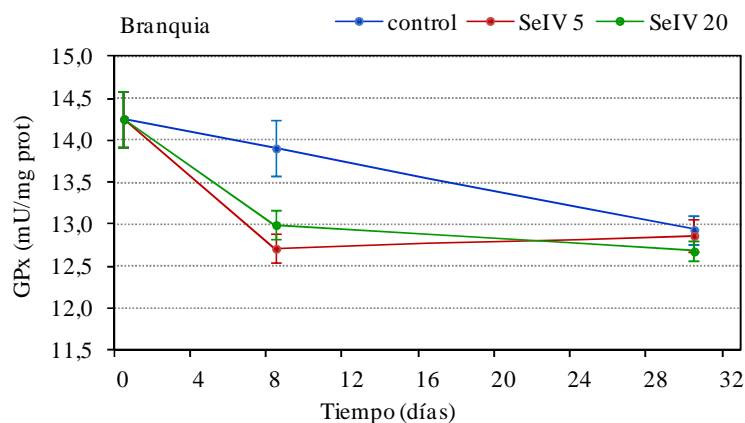


Figura 4.6. Evolución de la actividad GPx (media \pm error estándar; n = 10) en la branquia en cada una de las dosis del ensayo (control y selenito 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) durante el periodo de exposición.

La actividad de la GPx-Se fue similar a la GPx, ya que el selenito y el tiempo de exposición afectaron significativamente a la actividad de esta enzima solamente en el hepatopáncreas (ANOVA, $p=0.000$) (Figura 4.7 y Tabla 4.1) siendo la actividad de la GPx-Se menor en los individuos tratados con selenio.

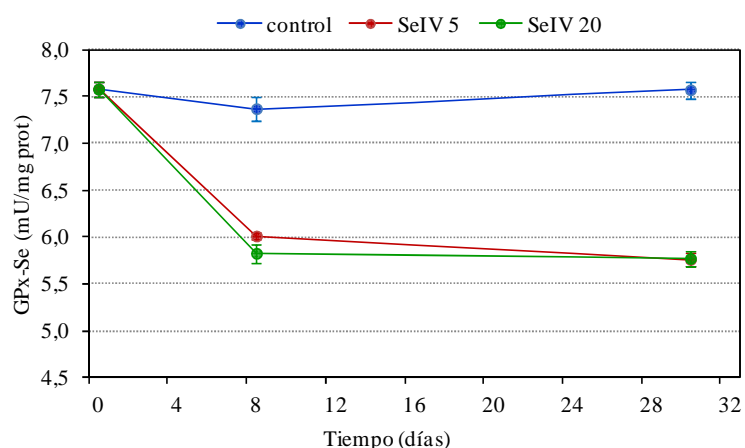


Figura 4.7 Evolución de la actividad GPx-Se (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas en cada una de las dosis del ensayo (control y selenito 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) durante el periodo de exposición.

La actividad GST en el hepatopáncreas presentó diferencias significativas respecto al selenito y el tiempo de exposición (ANOVA, $p=0.000$) (Figura 4.8 y Tabla 4.1), siendo también la actividad menor en los individuos tratados con selenio

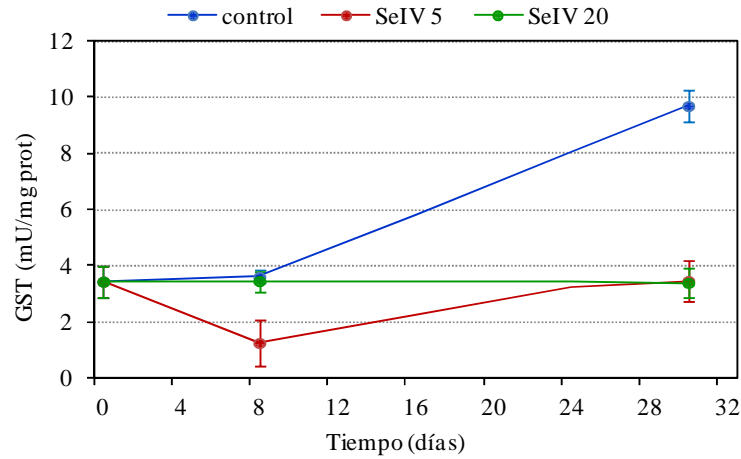


Figura 4.8. Evolución de la actividad GST (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas en cada una de las dosis del ensayo (control y selenito 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) durante el periodo de exposición.

En hepatopáncreas, la actividad LPO presentó diferencias significativas respecto al selenito (ANOVA, $p=0.016$) y respecto al tiempo (ANOVA, $p=0.041$), siendo la actividad en los individuos tratados con selenio menor que en el control (Tabla 4.1). Así mismo, al final del periodo de exposición presentó diferencias significativas entre todos los tratamientos (Kruskal-Wallis, $p=0.02$), siendo el nivel de peroxidación lipídica menor en los individuos tratados con 5 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito (U Mann-Whitney, $p=0.03$), por lo tanto la exposición a largo plazo a una concentración de selenito ambiental de 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito afectó a las almejas, pero se mantuvieron con la actividad LPO inferior al control (Figura 4.9).

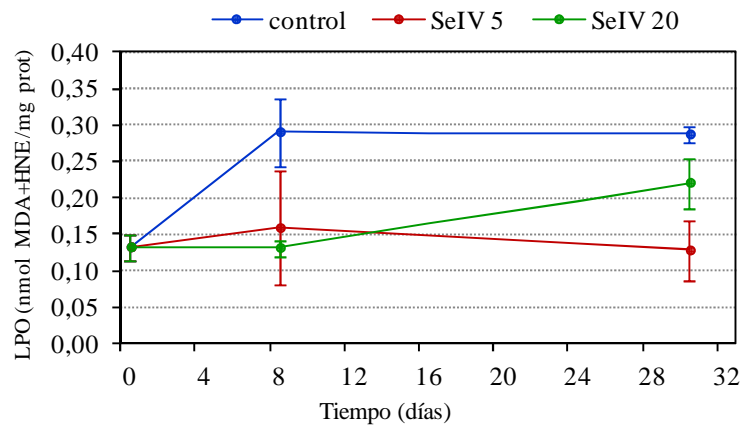


Figura 4.9. Evolución de la actividad LPO (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas en cada una de las dosis del ensayo (control y selenito 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) durante el periodo de exposición.

Tabla 4.1. ANOVA de dos vías realizado para la actividad enzimática en hepatopáncreas según las dosis de selenito (0, 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) y a lo largo del periodo de exposición.

Factores	Grados de libertad	<i>GPx</i>		<i>GPx-Se</i>		<i>GST</i>		<i>LPO</i>	
		F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
dosis	2	17,470	0,000	121,303	0,000	15,112	0,000	4,612	0,016
t	2	35,184	0,000	155,339	0,000	16,173	0,000	3,469	0,041
dosis * t	4	5,114	0,002	34,713	0,000	10,759	0,000	1,826	0,143

➤ *Selenito a altas concentraciones (250 - 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$)*

En los grupos de selenito a altas concentraciones, en algunos tratamientos, hubo mortalidad elevada, por lo que no se pudo llevar a cabo el tratamiento estadístico con ANOVA de dos vías a causa de la escasez de muestras, realizándose el estudio estadístico solo a los 45 días de la exposición. El ensayo con selenito a concentraciones de 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ terminó a los 14 días por lo que se ha tratado estadísticamente por separado.

La actividad GPx y el nivel de peroxidación lipídica (LPO) de las concentraciones de 250, 500 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito no presentaron diferencias significativas a los 45 días de exposición entre las distintas dosis y el control, ni respecto a la actividad inicial, en ninguno de los tejidos.

La actividad GPx-Se presentó diferencias significativas respecto al selenito al final del ensayo de exposición, tanto en hepatopáncreas (ANOVA, $p=0.000$) como en branquia (ANOVA, $p=0.026$). En hepatopáncreas el grupo control y la concentración de 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito tuvieron una actividad menor a los 45 días que el resto de los tratamientos. La actividad GPx-Se en branquia mostró, en el análisis post-hoc de Duncan, que era significativamente mayor en las almejas expuestas a selenito 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ durante 45 días que el control y el resto de los lotes con selenio (Figura 4.10).

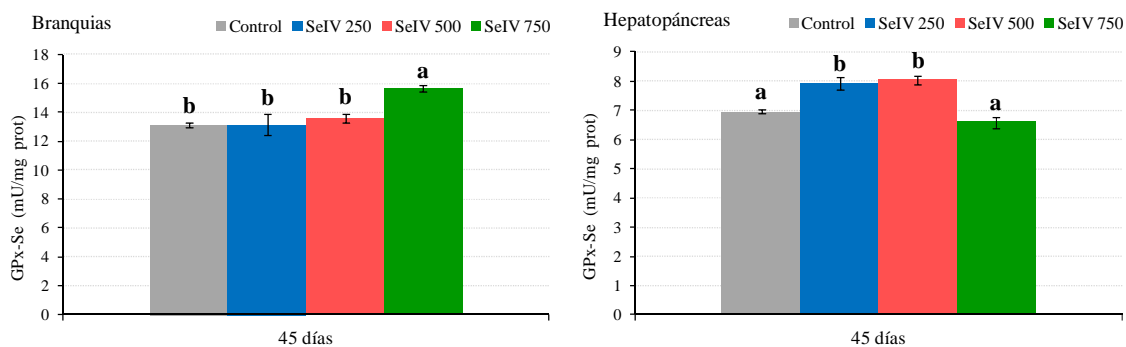


Figura 4.10. Actividad GPx-Se (media \pm error estándar; n = 10) al final del periodo de exposición (60 días), en ambos tejidos, para cada una de los grupos del ensayo (control y selenito 250, 500 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$). *Las letras diferentes presentan diferencias significativas al final del periodo de exposición)

Estas diferencias en esta actividad enzimática de las almejas expuestas a 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito con los tratamientos de 250 y 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ en hepatopáncreas y con el resto de los tratamientos en la branquia, puede ser debida a que alcanzan el 100% de mortalidad cuatro días después.

La actividad GST en el hepatopáncreas presentó diferencias significativas respecto al selenito (ANOVA, $p=0.000$), según los resultados del test post-hoc de Duncan, la actividad fue similar entre los individuos tratados con selenio (250, 500 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) y, al mismo tiempo, su actividad menor respecto al control (Figura 4.11).

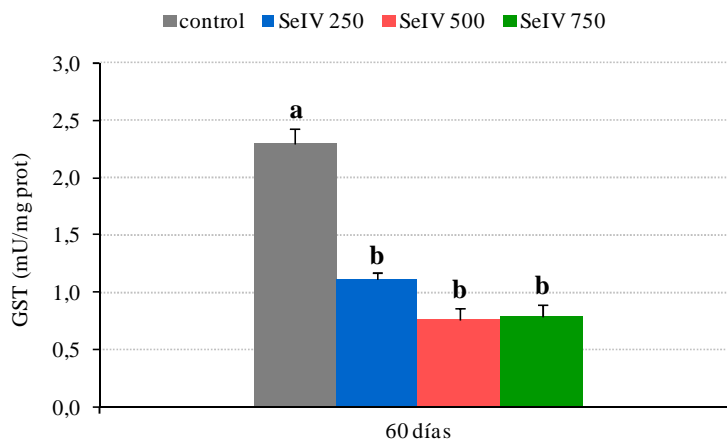


Figura 4.11. Actividad GST (media \pm error estándar; n = 10) al final de la exposición en el hepatopáncreas de los grupos expuestos a selenito 250, 500 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ y el control.

La actividad enzimática en branquia del grupo expuesto a 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito no presentó diferencias significativas a lo largo del periodo de exposición en ninguna de las enzimas estudiadas, sin embargo, en hepatopáncreas, la actividad GPx-Se de este grupo fue diferente significativamente (ANOVA, $p<0.018$) a lo largo del periodo de exposición,

aunque a los 14 días de exposición, la actividad no presentó diferencias respecto al inicio. En la actividad de GPx, GST y LPO, no presentó diferencias significativas (Figura 4.12).

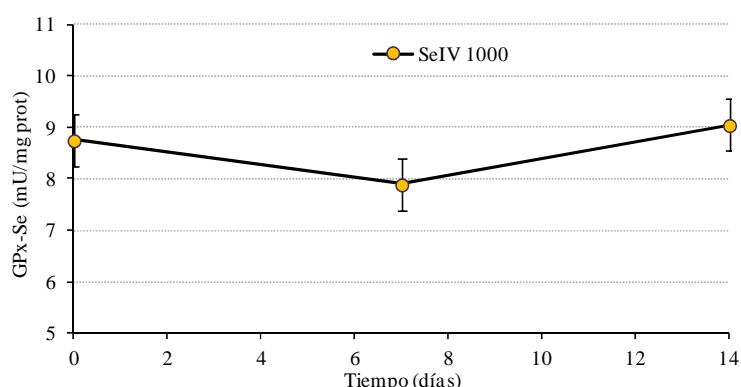


Figura 4.12. Actividad GPx-Se (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas a lo largo del periodo de exposición del grupo expuesto a $1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito

En general, las actividades GPx y LPO en los individuos expuestos al selenito a través del agua y los controles no presentaron, en el conjunto de los experimentos realizados con selenito, diferencias a nivel de branquia, y tampoco presentaron diferencias significativas a nivel de hepatopáncreas, excepto en las dosis de selenito ambiental (5 y $20 \mu\text{g Se L}^{-1}$), con diferencias respecto al tiempo y la dosis, y con un grado de actividad enzimática en los individuos control mayor que en los individuos tratados con las dosis ensayadas de selenito para ambas enzimas. La actividad GPx-Se, en branquia y hepatopáncreas, presentó una gran variabilidad tanto entre los grupos de almejas tratadas con distintas dosis de selenito como en el control.

4.1.3. ACUMULACIÓN DE SELENITO EN ALMEJA FINA

4.1.3.1. Selenio total en la almeja fina cultivada con selenito

➤ *Acumulación de selenio en el cuerpo completo*

La exposición continua de selenito durante 120 días en la almeja *Ruditapes decussatus* mostró una acumulación significativa (ANOVA, $p=0.000$) de selenio en el rango de concentraciones de 250 a $1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$, y dependió tanto del tiempo como del nivel de exposición como se observa en la Figura 4.13. Por el contrario, las almejas expuestas a selenito ambiental (5 - $20 \mu\text{g Se L}^{-1}$) de forma continua durante un mes, no presentaron acumulación al final del periodo experimental.

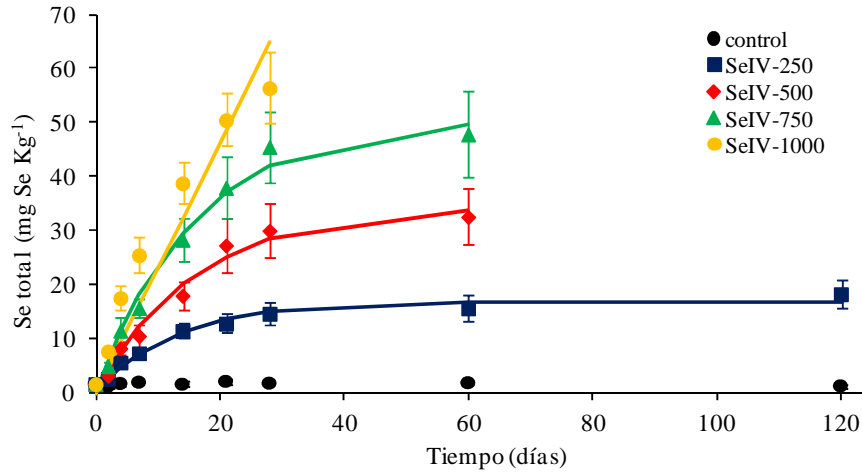


Figura 4.13. Concentración de selenio (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en el cuerpo completo de las almejas durante el experimento de acumulación de selenito.

Las concentraciones de selenito en el agua de los cultivos se mantuvieron constantes a lo largo de todo el ensayo (ANOVA, $p > 0.820$).

La concentración de Se en el cuerpo completo de las almejas control al inicio de la exposición fue de $1,7 \pm 0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ y permaneció constante durante todo el experimento (ANOVA, $p=0.0555$).

Para concentraciones de $750 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito en agua e inferiores, inicialmente se observó una absorción lineal y, posteriormente, se llegó a un estado estacionario en el que las concentraciones de Se mostraron variaciones menores, siguiendo modelos cinéticos de primer orden. La concentración de selenio predicha no difiere significativamente de los valores observados y los coeficiente de correlación del análisis de regresión son mayores que 0,985, indicando que la cinética es de primer orden, y por lo tanto, se puede calcular las relaciones constante de absorción y depuración, como se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Coeficientes cinéticos (\pm desviación estándar) para los experimentos de acumulación de *Ruditapes decussatus* expuesta a varias concentraciones de selenito durante 120 días. (K_u : constante de absorción; K_d : constante de eliminación).

Concentración de exposición ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	BCF	K_d (día^{-1})	K_u ($\text{L} \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	Coefficiente de correlación (R)
250	67 ± 10	$0,083 \pm 0,020$	$0,0055 \pm 0,0005$	0,985
500	70 ± 12	$0,062 \pm 0,015$	$0,0043 \pm 0,0010$	0,991
750	68 ± 12	$0,063 \pm 0,006$	$0,0042 \pm 0,0004$	0,994
1000	--	---	---	---

Los factores de bioconcentración (BCFs) fueron 67 ± 10 , 70 ± 12 y 68 ± 12 para las almejas expuestas a 250, 500 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, respectivamente, no existiendo diferencias significativas (ANOVA, $p=0.912$). Sin embargo, para el grupo expuesto a 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, la mortalidad de las almejas se produjo a los 30 días, antes de alcanzar el estado estacionario ($\text{Se (mg Kg}^{-1}) = 2,314 \cdot t \text{ (días)}$; $R=0,945$).

La constante de absorción fue significativamente mayor en el grupo de almejas expuesta a una concentración de selenito de 250 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ que en los grupos expuestos a 500 y 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ (ANOVA, $p=0.042$), mientras que no existieron diferencias significativas en la constante de depuración entre las concentraciones (ANOVA, $p=0.132$). Así mismo, hay diferencias significativas entre la constante de acumulación y la de eliminación en todas las concentraciones testadas (ANOVA, $p \leq 0.00029$), siendo la constante de eliminación 15 veces mayor que la de absorción.

En general, para el selenito se observó un incremento de la concentración de selenio en el cuerpo completo cuando aumenta la concentración de selenito en el agua durante 30 días de exposición, como se muestra en la Figura 4.14 presentando un comportamiento lineal ($R=0,997$) sin llegar al estado estacionario, lo que permite predecir la concentración necesaria de exposición en el agua al selenito durante 30 días para obtener una concentración determinada en las almejas.

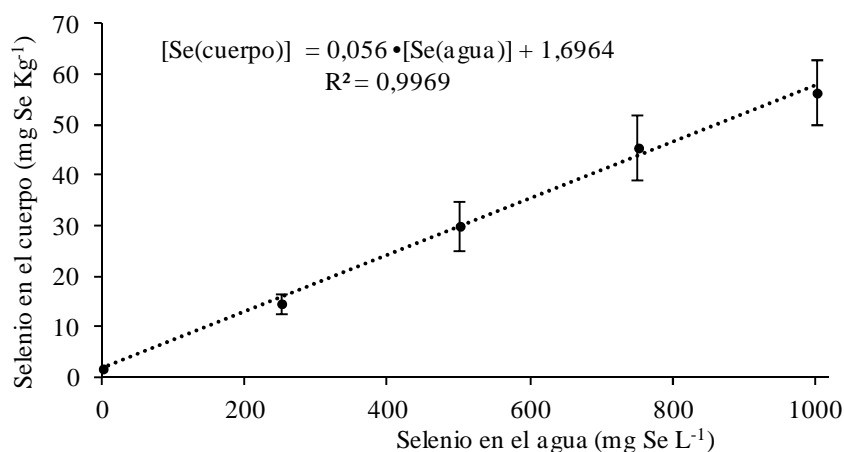


Figura 4.14. Relación entre la concentración de Se (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenito en el agua después de 30 días de exposición.

➤ *Distribución tisular del selenio*

Cuando se determinó la concentración de selenio en los distintos tejidos de la almeja, se observó que presentaba el mismo comportamiento que para el cuerpo completo. La concentración de Se en los tejidos de las almejas control permaneció constante durante todo el experimento (ANOVA, $p=0.0555$). No se observaron diferencias significativas en la concentración de Se en las branquias y hepatopáncreas del grupo de almejas control (ANOVA, $p = 0.121$), pero estas concentraciones fueron significativamente mayores que en manto, pie y resto de vísceras, siendo la branquia 1,8; 1,6 y 1,2 veces mayor, respectivamente (ANOVA, $p \leq 0.009$). En la Figura 4.15 se muestra como varió la concentración de selenio en los distintos órganos durante los 120 días de la experiencia de acumulación de selenito en las almejas expuestas a 0, 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ con renovación diaria.

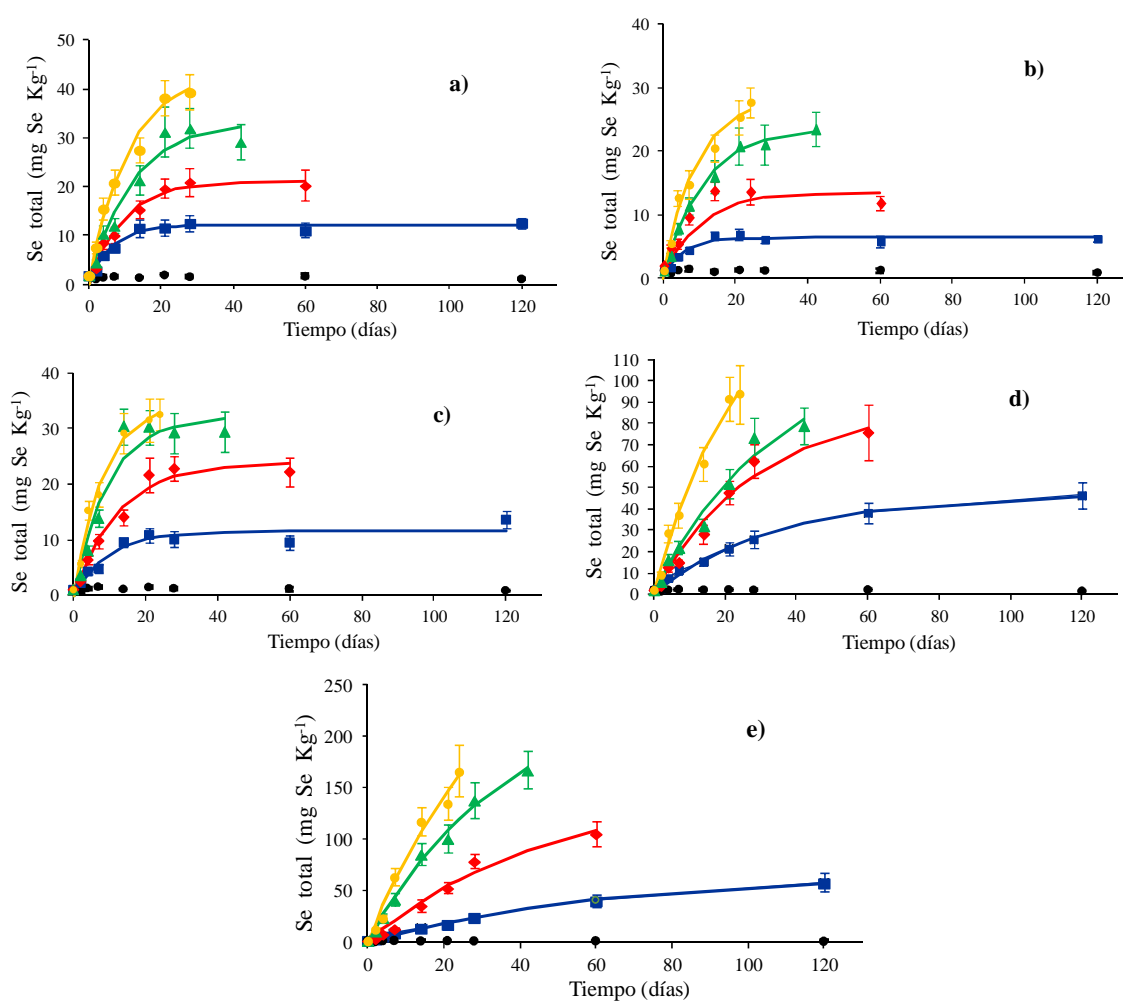


Figura 4.15. Concentración de selenio (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en los tejidos de las almejas durante el experimento de acumulación de selenito con distintas concentraciones; a) Manto; b) Pie; c) Vísceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas. (* 0 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, ■ 250 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, ◆ 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, ▲ 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, ● 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$)

La concentración de selenio predicha no difiere significativamente de los valores observados siguiendo modelos cinéticos de primer orden, y los coeficientes de correlación del análisis de regresión son mayores que 0,956, como se observa en la Tabla 4.3, en la que también se muestran las constantes de absorción (K_u) y eliminación (K_d), y los BCFs.

Los resultados de los BCFs mostraron diferencias significativas entre los distintos tejidos (ANOVA, $p = 0.0004$), acumulándose la mayor cantidad de selenio en hepatopáncreas y branquias, con valores para el hepatopáncreas de 271 ± 51 , 287 ± 48 , 326 ± 44 , 328 ± 89 en las almejas expuestas a 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, respectivamente, mientras que el pie es el órgano donde menos selenio se acumula, 25 ± 3 , 28 ± 1 , 31 ± 4 y 28 ± 2 en las almejas expuestas a 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, respectivamente, presentando el siguiente orden de acumulación:

Pie < Vísceras < Manto < Branquias < Hepatopáncreas

En todos los órganos se mantuvieron constantes los distintos coeficientes según aumentó la concentración de exposición en el agua, siendo siempre la constante de eliminación mayor que la de absorción, con una relación entre ellas mayor en pie, manto y vísceras (35, 23 y 24 veces respectivamente) que en branquia y hepatopáncreas (7 y 3 veces respectivamente), ya que estos tienen una menor tasa de eliminación.

Tabla 4.3. Coeficientes cinéticos (\pm desviación estándar) en los órganos para los experimentos de acumulación en *Ruditapes decussatus* expuesto a varias concentraciones de selenito durante 120 días. (Ku: constante de absorción; Kd: constante de eliminación).

Concentración de exposición ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	BCF	K_d (día^{-1})	K_u ($\text{L} \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	Coefficiente de correlación (R)
Pie				
250	25 \pm 3	0,190 \pm 0,013	0,0048 \pm 0,0006	0,956
500	28 \pm 1	0,105 \pm 0,014	0,0030 \pm 0,0080	0,969
750	31 \pm 4	0,092 \pm 0,007	0,0029 \pm 0,0003	0,996
1000	28 \pm 2	0,112 \pm 0,008	0,0031 \pm 0,0004	0,988
Manto				
250	48 \pm 6	0,160 \pm 0,017	0,0077 \pm 0,0007	0,977
500	42 \pm 5	0,106 \pm 0,014	0,0044 \pm 0,0006	0,988
750	44 \pm 4	0,083 \pm 0,007	0,0037 \pm 0,0006	0,980
1000	44 \pm 4	0,090 \pm 0,016	0,0039 \pm 0,0006	0,990
Visceras				
250	46 \pm 5	0,101 \pm 0,069	0,0048 \pm 0,0007	0,968
500	47 \pm 5	0,079 \pm 0,004	0,0038 \pm 0,0004	0,989
750	43 \pm 5	0,104 \pm 0,005	0,0044 \pm 0,0004	0,977
1000	35 \pm 4	0,119 \pm 0,014	0,0041 \pm 0,0006	0,995
Branquias				
250	188 \pm 25	0,030 \pm 0,005	0,0055 \pm 0,0008	0,996
500	186 \pm 40	0,035 \pm 0,012	0,0046 \pm 0,0009	0,989
750	157 \pm 21	0,029 \pm 0,005	0,0044 \pm 0,0006	0,988
1000	161 \pm 29	0,039 \pm 0,008	0,0061 \pm 0,0008	0,995
Hepatopáncreas				
250	271 \pm 51	0,016 \pm 0,003	0,004 \pm 0,0006	0,997
500	287 \pm 48	0,023 \pm 0,003	0,0065 \pm 0,0006	0,989
750	326 \pm 44	0,028 \pm 0,004	0,0091 \pm 0,0014	0,997
1000	328 \pm 89	0,030 \pm 0,008	0,0093 \pm 0,0010	0,991

En general, se observó un incremento de la concentración de selenio en los distintos órganos de las almejas cuando se incrementó la concentración de selenito en el agua durante 21 días de exposición, como se muestra en la Figura 4.16 y presenta un comportamiento lineal ($R > 0.958$).

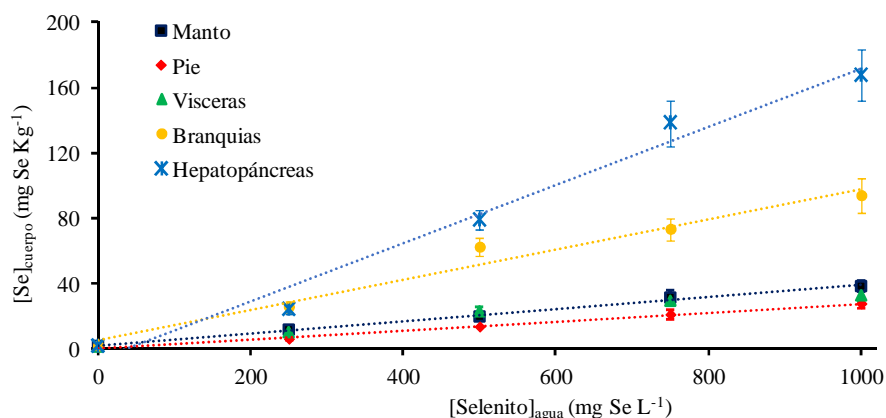


Figura 4.16. Relación entre la concentración de Se (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenito en el agua después de 30 días de exposición.

➤ **Distribución subcelular del selenio**

Los resultados de la distribución subcelular de las almejas expuestas a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ a dos tiempos de exposición, 14 y 30 días, mostraron que la recuperación del selenio en la fracción subcelular del tejido con respecto al total se encuentra entre el 107 y 110% para el hepatopáncreas y entre el 88 % y 117 % para las branquias (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Concentración de Selenio total (mg Se Kg^{-1} , peso seco) y la distribución de las fracciones biológicamente activo, detoxificado y núcleos y desechos celulares, en hepatopáncreas y branquias, en almejas expuestas con $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito durante 14 y 30 días. (LD: por debajo del límite de detección)

	Hepatopáncreas			Branquias		
	Control	14 días	30 días	Control	14 días	30 días
Selenio total	1,96	35,9	79,0	2,09	28,3	62,4
Distribución del selenio						
Se activo biológicamente	<LD	13,0	24,5	<LD	1,08	9,6
Se detoxificado biológicamente	<LD	19,3	30,8	<LD	13,8	57,9
Núcleos y desechos celulares	<LD	6,20	32,0	<LD	10,1	3,61

Con respecto al contenido total en la distribución del Se ($71,11 \text{ mg Se Kg}^{-1}$), en el hepatopáncreas, entre el 28% y el 33% del contenido de selenio se encuentra biológicamente activo, mientras que en las branquias es un porcentaje más pequeño, entre el 4% y 13 %. La mayor parte del selenio se localiza en las fracciones biológicamente detoxificadas, rango comprendido entre el 35-50% y el 55-81% para hepatopáncreas y branquias, respectivamente (Figura 4.17).

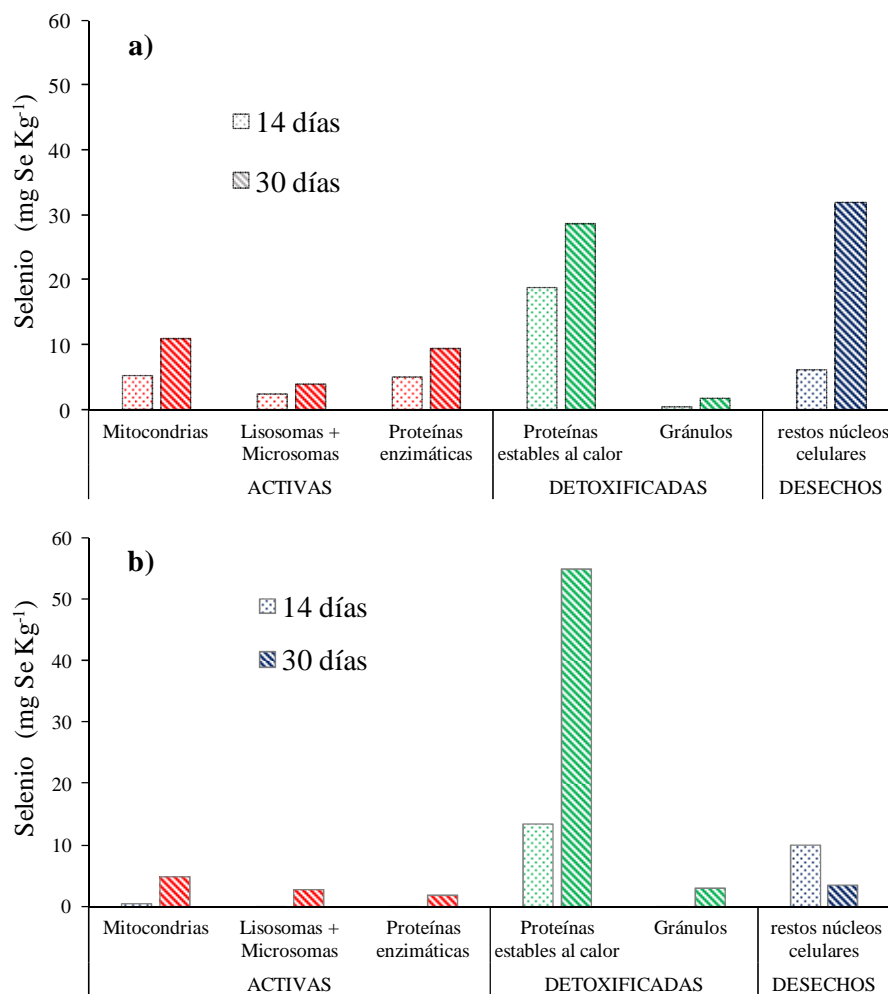


Figura 4.17. Concentración de selenio (mg Se Kg^{-1} , peso seco) en las fracciones de la separación subcelular de hepatopáncreas y branquias en almejas expuestas a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito durante 14 y 30 días.

4.1.3.2. Especiación de selenio en almeja fina cultivada con selenito

Se realizó el estudio de la especiación en una dosis de cada una de las especies de selenio, realizándose en el selenito en $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$.

Los resultados de especiación en los extractos de la hidrólisis enzimática tanto en los cuerpos completos de almejas en los tejidos de las almejas cultivadas en presencia de selenito, mostraron la presencia SeMetSeCys y tres especies desconocidas, que eluían a 9,9; 10,3 y 21,3 min mediante cromatografía de intercambio catiónico acoplado instrumental HPLC-UV-TR-HG-AFS.

En cuanto al residuo de la hidrólisis enzimática tratado con hidróxido sódico, la especie que predominó fue Se(IV) llevando a cabo la separación por intercambio aniónico y usando el mismo acoplamiento instrumental.

Los resultados de especiación en los extractos de hidrólisis enzimática con proteasa/lipasa, tanto en el cuerpo completo como en los tejidos de las almejas cultivada en presencia de $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ durante 60 días mostró la presencia de distintas especies de selenio (Figura 4.18).

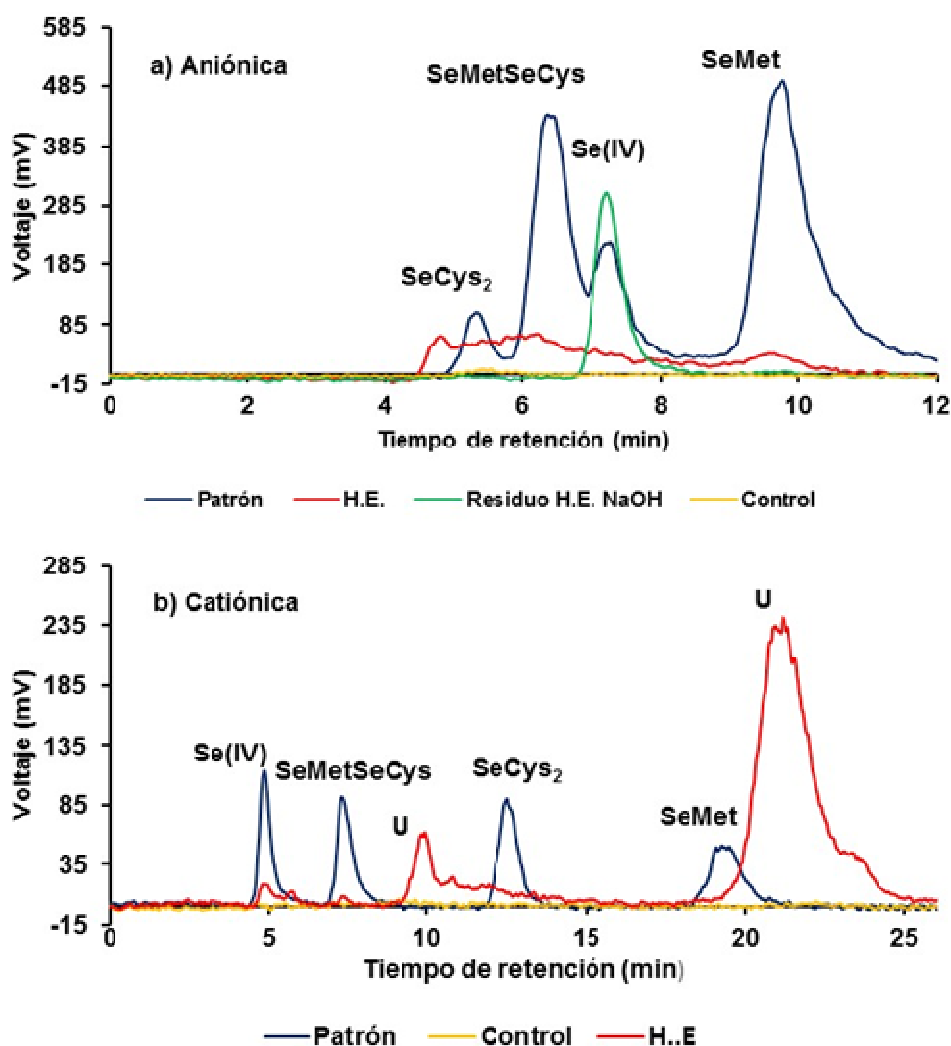


Figura 4.18. Cromatogramas de especies de selenio en almejas cultivadas con $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito durante 60 días mediante extracción secuencial de proteasa/lipasa y NaOH 0,02 M con HPLC-UV-TR-HG-AFS: a) Intercambio aniónico; b): intercambio catiónico (H.E., hidrólisis enzimática; U: desconocido)

➤ *Especiación de selenio en el cuerpo completo*

El porcentaje de especies identificadas con respecto al total estuvo entre el 4 y 16 %, indicando que la mayoría del selenio presente en las almejas corresponde a especies desconocidas.

En la Figura 4.19 se muestra como varió la concentración de las distintas especies de selenio en el cuerpo completo de las almejas durante 60 días en la experiencia de acumulación de selenito en las almejas expuestas a 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, para el caso de las especies desconocidas se a compararon las señales con el área del patrón de Se(IV).

$$\text{Se(IV)} > \text{SeMetSeCys}$$

La concentración de selenio predicha no discrepó significativamente de los valores observados siguiendo modelos cinéticos de primer orden y los coeficientes de correlación del análisis de regresión fueron mayores que 0,956, similares a las concentraciones obtenidas en selenio total.

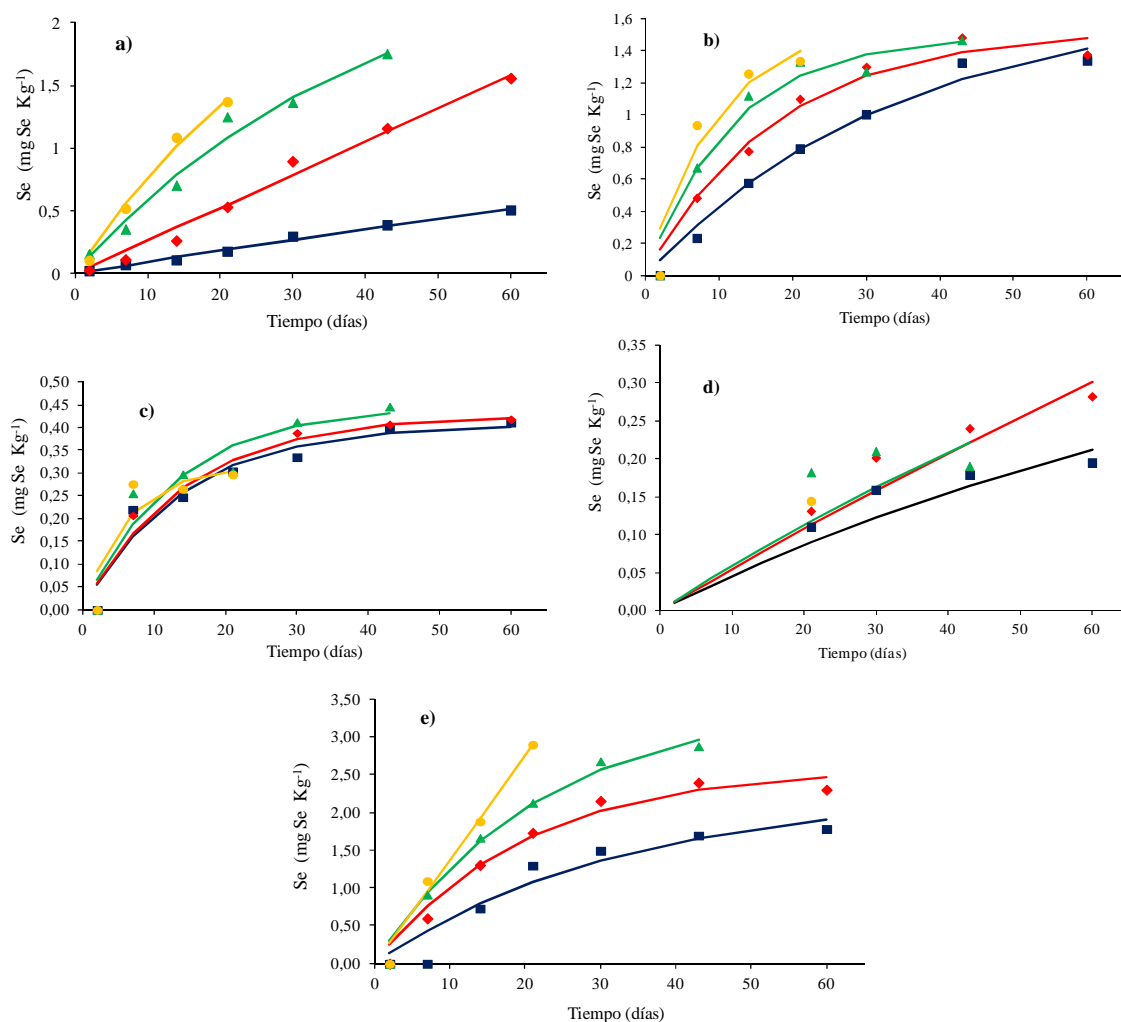


Figura 4.19. Concentración (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) de especies de selenio en el cuerpo completo de almejas mediante HPLC-TR-UV-HG-AFS durante el experimento de acumulación de selenito con distintas concentraciones y renovación diaria; a) Se(IV); b) SeMetSeCys; c) Compuesto desconocido U2; d) Compuesto desconocido U3; e) Compuesto desconocido U4. (■ 250 $\mu\text{g Se L}^{-1}$; ◆ 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$; ▲ 750 $\mu\text{g Se L}^{-1}$; ● 1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$)

➤ *Especiación de selenio en los tejidos*

La especiación en los distintos tejidos de las almejas llevó a cabo en el grupo de almejas cultivadas en presencia de $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito a 14, 30 y 60 días de exposición.

Los resultados fueron similares a los obtenidos en el cuerpo completo, en cuanto a las especies presentes. El Se(IV) y el compuesto desconocido U4 fueron las especies que estaban presentes en todos los tejidos, mientras que la SeMetSeCys, U2 y U3 solamente se encontraron presentes en el hepatopáncreas.

De forma similar al resultado obtenido en el selenio total en los tejidos, el pie y el manto fueron los tejidos que presentaron menos concentración de especies, mientras que la más alta la presentaron branquias y hepatopáncreas, como se puede comprobar en la Figura 4.20.

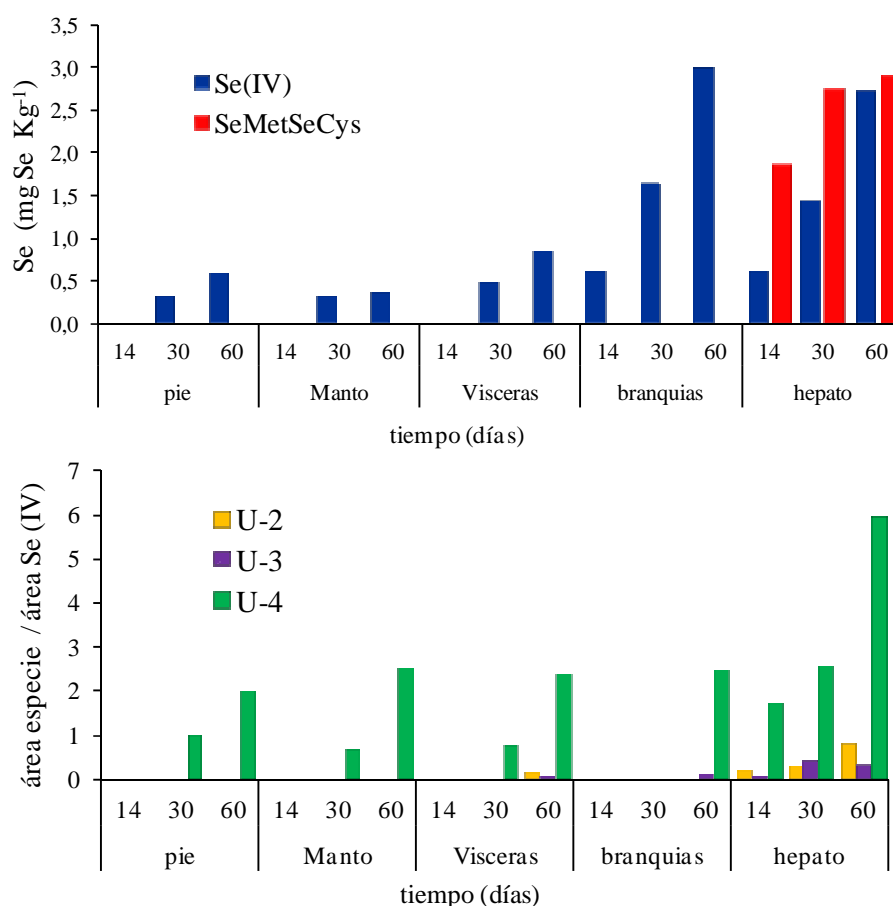


Figura 4.20. Concentración de especies de selenio (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) y relación de área de especies desconocidas respecto al área de Se(IV), en los tejidos de almejas cultivadas en presencia de $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito a los 14, 30 y 60 días de exposición.

➤ ***Distribución subcelular del selenio en los tejidos***

Por último, se determinaron las especies de selenio en las distintas fracciones de la separación subcelular, tanto en las branquias como en el hepatopáncreas, de las almejas expuestas a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de Se(IV) durante 30 días.

Los resultados mostraron que en la fracción de lisosomas no se detectó ninguna especie de selenio para los tejidos estudiados.

En las branquias solamente se detectó Se(IV), encontrándose en mayor porcentaje en la fracción de los gránulos y no detectándose en los lisosomas, proteínas enzimáticas y núcleos y desechos celulares.

En el hepatopáncreas, además de detectarse Se(IV), se detectaron otras especies desconocidas U2 y U4, liberándose el mayor porcentaje de Se(IV) en la fracción de los gránulos, mientras que la especie no identificadas, U2 y U4, se liberan en la fracción de núcleos y desechos celulares y en la fracción de proteínas enzimáticas, respectivamente, como se muestra en la Figura 4.21. Estos resultados, indicaron que la especie de selenio U4 está biológicamente activa en el hepatopáncreas, mientras que el Se(IV) estaba biológicamente detoxificado.

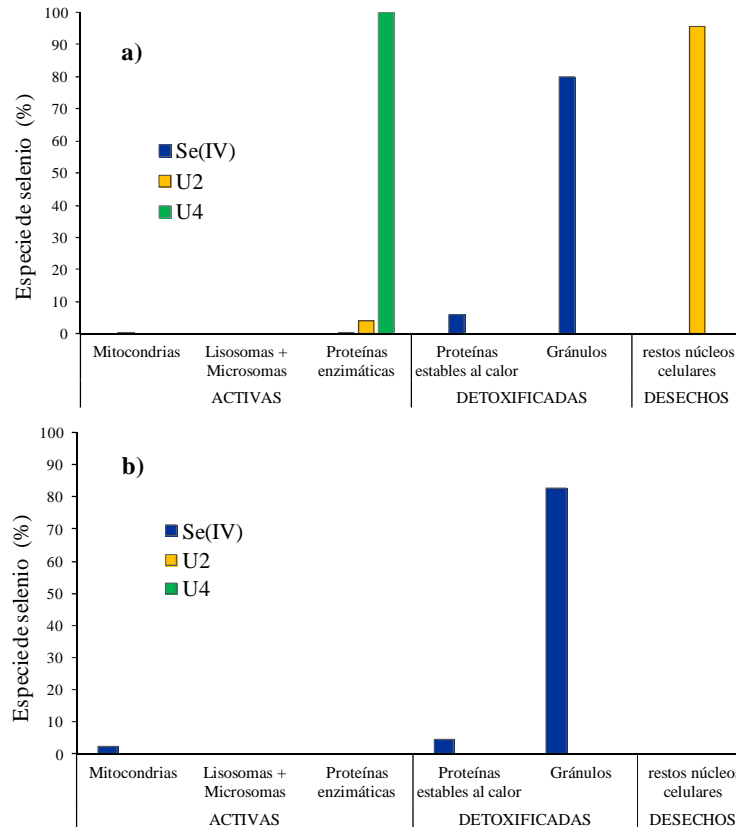


Figura 4.21. Especies de selenio (%) extraídas de branquias (a) y hepatopáncreas (b) en almejas expuestas a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito durante 30 días en las fracciones de la extracción secuencial mediante hidrólisis enzimática-NaOH y determinación por HPLC-TR-UV-HG-AFS.

4.1.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENITO EN LAS ALMEJAS

Los resultados del enterramiento (%) de las almejas, después de haber estado expuestas durante 60 días a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, se muestran en la Figura 4.22, donde se puede observar que la TE(50) se alcanzó a las 48 horas, enterrándose cerca del 100% a los 7 días.

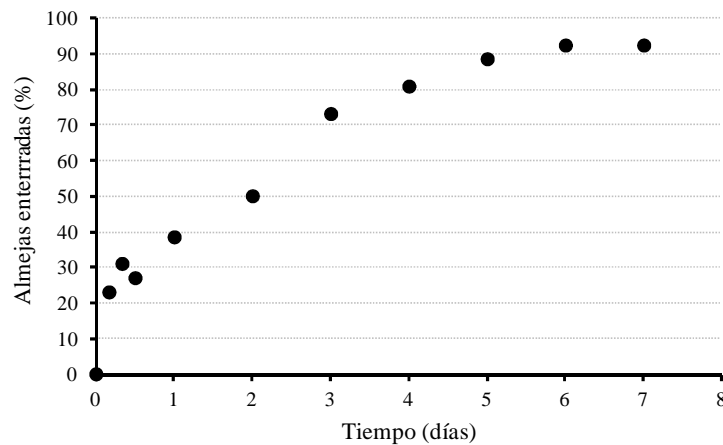


Figura 4.22. Evolución del enterramiento de las almejas durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber estado expuestas durante 60 días a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de selenito.

En cuanto a la supervivencia, en la Figura 4.23 se puede observar la evolución en la primera semana del ensayo de depuración, resaltando que las mortalidades se registraron en los días 3 y 5 de la depuración, manteniendo una supervivencia del 50 % a los 7 días.

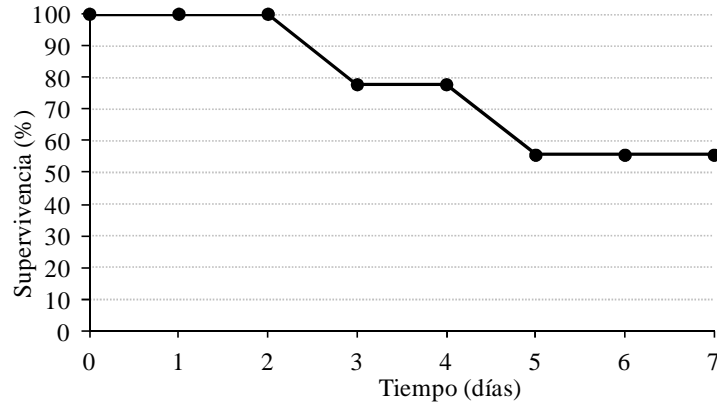


Figura 4.23. Evolución de la supervivencia (%) de las almejas durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber estado expuestas durante 60 días a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de selenito.

➤ *Eliminación del Se en el cuerpo completo*

Los resultados de la eliminación de selenito en el cuerpo completo de la almeja mantuvieron una curva exponencial con respecto al tiempo, siendo la concentración final de selenio de $2,94 \pm 0,12 \text{ mg Se Kg}^{-1}$ (en peso seco) (Figura 4.24), ajustándose a cinéticas de primer orden. Para su ajuste se han utilizado dos modelos cinéticos, de un compartimento (exponencial simple, ecuación 1) y de dos compartimentos (exponencial doble, ecuación 2).

$$C_{\text{org}} = C_0 \cdot e^{(-Kd \cdot t)} \quad (1)$$

$$C_{\text{org}} = A_1 \cdot e^{(-Kd1 \cdot t)} + A_2 \cdot e^{(-Kd2 \cdot t)} \quad (2)$$

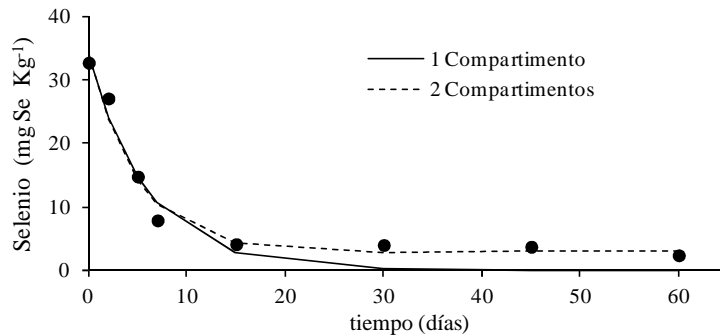


Figura.4.24. Comparación del contenido de Se observado (●) y predicho en el cuerpo completo de las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos de depuración de 1 compartimento y 2 compartimentos.

Los resultados mostraron que la concentración de selenio predicha no difiere significativamente de las concentraciones observadas, con coeficientes de correlación 0,974 y 0,989, respectivamente, obteniéndose así tanto las constantes de eliminación (K_d , K_{d1} y K_{d2}), como la vida media biológica ($t_{1/2}$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Coeficientes cinéticos para los experimentos de depuración del selenito en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[Se]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

$[Se]_i$	Modelo de 1 compartimento		Modelo de 2 compartimentos	
32,6	A	33,8	A_1	31,7
	K_d	0,166	K_{d1}	0,197
	$t_{1/2}$	4	$(t_{1/2})_1$	3
	R	0,974	A_2	2,45
			K_{d2}	-0,004
			$(t_{1/2})$	---
			R	0,988

➤ **Eliminación del Se en los tejidos**

El mismo comportamiento se observó en los tejidos de las almejas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6 y Figura 4.25 y, comprobándose que el modelo cinético de dos compartimentos se ajusta mejor a los datos observados para todos los órganos, con coeficientes de regresión mayores de 0,992. Por otra parte, la vida media biológica ($t_{1/2}$) es mayor en el modelo cinético de un compartimento para todos los órganos, excepto las vísceras. Además, se observa mediante el modelo cinético de dos compartimentos que el selenio persiste en hepatopáncreas y branquias 2 días, y en el pie y manto, 1 día.

Tabla 4.6. Coeficientes cinéticos para el manto, pie, vísceras, branquias y hepatopáncreas durante el experimento de depuración del selenito en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

	Manto	Pie	Vísceras	Branquias	Hepatopáncreas
1 compartimento					
$[\text{Se}]_i$	20,3	11,7	22,2	75,9	106
A	17,9	10,7	20,24	64,1	87,3
K_d	0,071	0,079	0,051	0,042	0,050
$t_{1/2}$	9	8	12	15	13
R	0,974	0,981	0,985	0,935	0,889
2 compartimentos					
$[\text{Se}]_i$	20,3	11,9	22,2	75,9	106
A_1	5,49	3,18	3,67	30,2	61,7
K_{d1}	1,08	1,02	8,47	0,377	0,289
$(t_{1/2})_1$	1	1	1	2	2
A_2	14,78	8,68	18,5	45,1	43,7
K_{d2}	0,05	0,056	0,044	0,023	0,012
$(t_{1/2})_2$	12	11	15	28	51
R	0,992	0,996	0,997	0,996	0,999

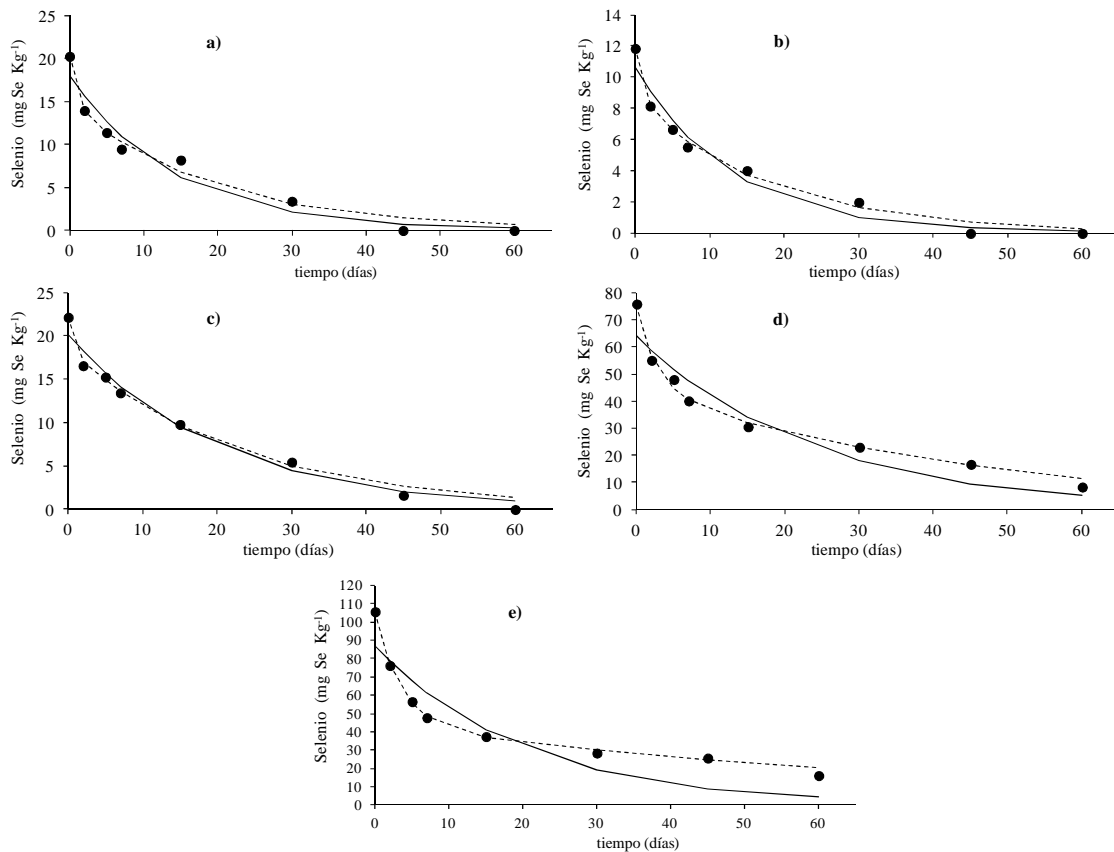


Figura.4.25. Comparación del contenido de Se observado (●) y predicho en las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua). a) Manto; b) Pie; c) Vísceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas

➤ *Especiación del Se*

Por último, se determinaron las especies de selenio presentes en el cuerpo completo, e igual que en acumulación, las especies que se encuentran en las muestras son Se(IV), SeMetSeCys y tres especies desconocidas U2,U3 y U4. Los resultados para todas las especies, tanto identificadas como desconocidas, se ajusta a un modelo cinético de primer orden (Tabla 4.7 y Figura 4.26). El tiempo de vida media, indica que la eliminación de las especies sigue la siguiente clasificación:

$$\text{SeMetSeCys} < \text{U4} < \text{U3} < \text{U2}=\text{U5}$$

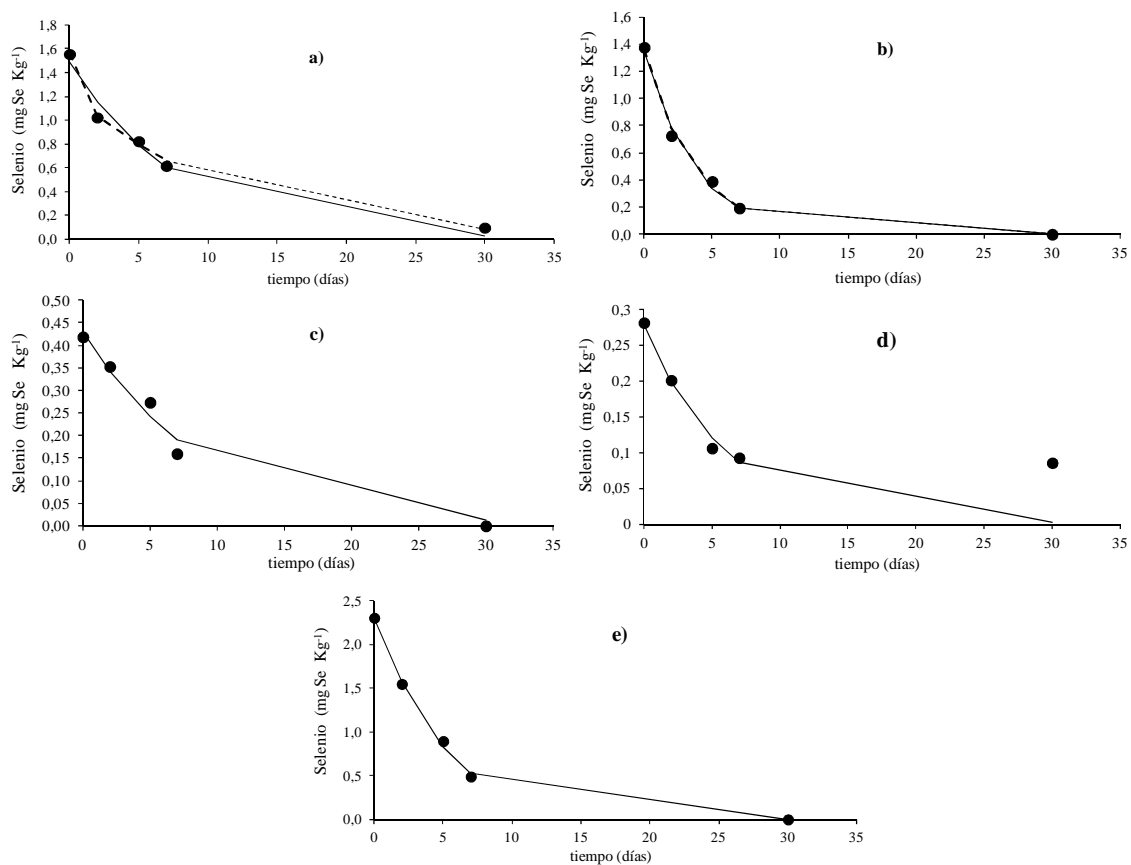


Figura 4.26. Comparación del contenido de especies de Se observado (●) y predicho en las almejas procedentes del cultivo con selenito, durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua). a) Se(IV); b) SeMetSeCys; c) U2; d) U3; e) U4

Tabla. 4.7. Coeficientes cinéticos para las especies presentes de Se durante el experimento de depuración del selenito en *R. decussatus* ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

	Se(IV)	SeMetSeCys	U2*	U3*	U4*
1 compartimento					
$[\text{Se}]_i$	1,56	1,38	0,418	0,279	2,30
A	1,49	1,37	0,431	0,279	2,31
K_d	0,128	0,278	0,116	0,167	0,203
t_{1/2}	5	2	5	4	3
R	0,987	0,997	0,988	0,866	0,998
2 compartimentos					
$[\text{Se}]_i$	1,56	1,38	0,418	0,282	2,31
A₁	1,23	-0,08	---	10,13	-7,127
K_{d1}	0,089	0,278	---	0,167	0,309
(t_{1/2})₁	7	2	---	4	2
A₂	0,36	1,44	---	-9,855	9,427
K_{d2}	8,36	0,278	---	0,167	0,277
(t_{1/2})₂	0	2	---	4	2
R	0,998	0,997	---	0,865	0,999

* Concentración obtenida a partir de la relación de señal con respecto al Se(IV)

4.2. SELENOMETIONINA A TRAVÉS DEL MEDIO ACUÁTICO

4.2.1. MORTALIDAD

Los resultados de mortalidad de las almejas expuestas a distintas concentraciones de SeMet mostraron una mortalidad del 100 % para almejas expuestas a 50 y 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet en el agua a los 7 y 30 días, respectivamente, mientras el grupo de almejas expuestas a 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet en el agua alcanzó el 50% de mortalidad a los 80 días de exposición (Figura 4.27).

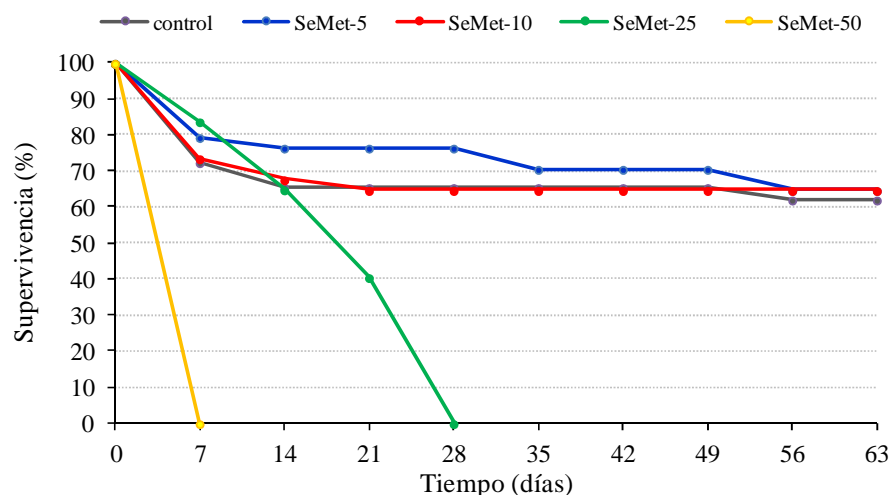


Figura 4.27. Evolución de la supervivencia acumulada en las almejas expuestas a distintas dosis de SeMet a través del agua

4.2.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

4.2.2.1. Tasa de aclaramiento (TA)

Respecto a la tasa de aclaramiento, no se observaron diferencias significativas en el grupo de almejas expuestas a 5, 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet y el control con respecto al tiempo y a la selenometionina (ANOVA, $p \geq 0,875$) durante el periodo de exposición, mientras que para el grupo de almejas expuestas a 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet se observaron diferencias significativas a los 14 días (ANOVA, $p < .003$), con una disminución con respecto al control de un 37 % (Figura 4.28).

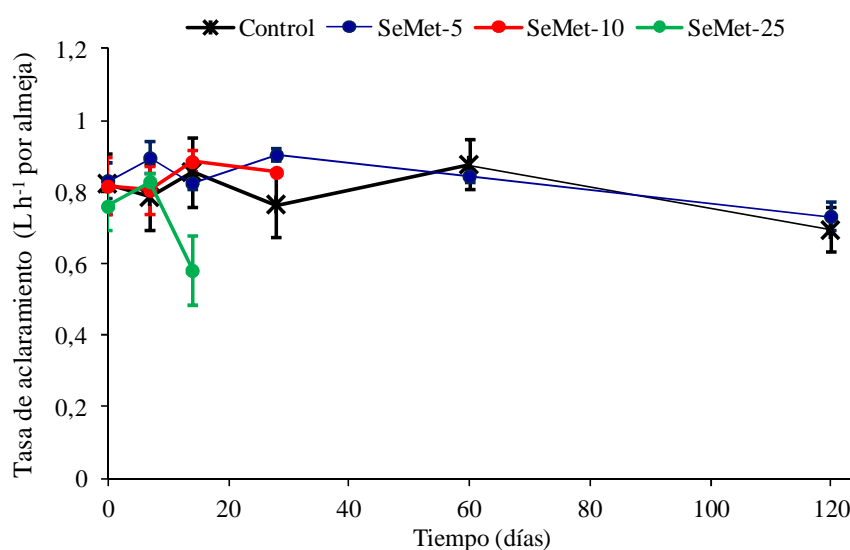


Figura 4.28. Evolución de la tasa de aclaramiento en *R. decussatus* expuestas a distintas dosis de SeMet en el agua (5, 10 y 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) durante 120 días.

4.2.2.2. Actividad enzimática

Se analizaron las variaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GPx dependiente de Se y GST, así como en el nivel de peroxidación lipídica (LPO), como consecuencia del estrés oxidativo en las almejas por la exposición a SeMet en el agua de cultivo. El ensayo con SeMet a concentraciones de $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ tuvo una alta mortalidad, por lo que se ha tratado estadísticamente por separado.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas a los 60 días de exposición en la actividad GPx y GPx-Se y en el nivel de peroxidación lipídica (LPO) entre el control y las concentraciones de 5 y $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, así mismo tampoco mostraron diferencias las actividades enzimáticas al final de la exposición respecto a la actividad inicial.

La actividad GST en el hepatopáncreas presentó diferencias significativas al final del periodo de exposición respecto a la dosis de SeMet (ANOVA, $p < .0003$), aplicando un test post-hoc de Tukey se obtuvo que los individuos del control tenían una actividad enzimática mayor que los individuos tratados y, además, que entre ambas concentraciones de SeMet (5 y $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$), los individuos tratados con la menor concentración, fueron los que tuvieron menor actividad GST. (Figura 4.29)

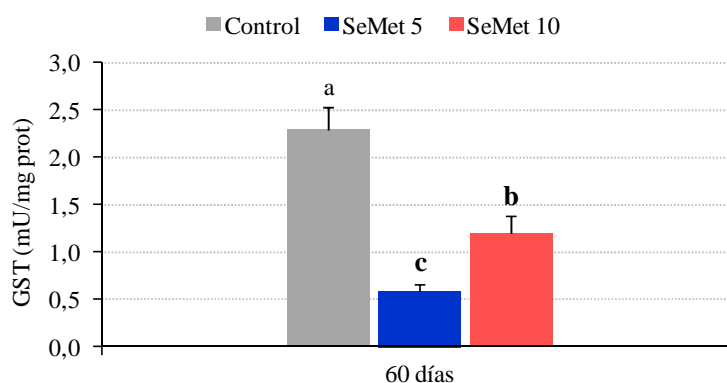


Figura 4.29. Actividad GST (media \pm error estándar; $n = 10$) en el hepatopáncreas al final de la exposición, para el control y los grupos expuestos a 5 y $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet.

Respecto al grupo de almejas expuestas a $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, la actividad enzimática en branquia no presentó diferencias significativas a lo largo del periodo de exposición en ninguna de las enzimas estudiadas. Sin embargo, en hepatopáncreas, su actividad GST fue diferente significativamente (ANOVA, $p < .016$), reduciéndose la actividad de la enzima al exponerla a la SeMet-25 (Figura 4.30) Este grupo de almejas expuestas a $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de

SeMet, no presentó diferencias en la actividad respecto al resto de las enzimas, GPx , GPx-Se y LPO.

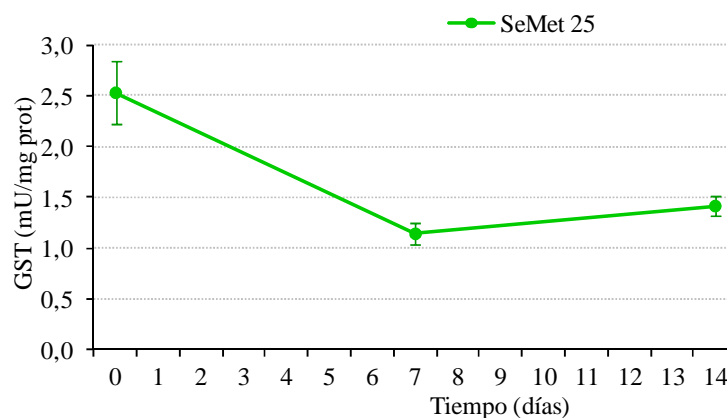


Figura 4.30. Evolución de la actividad GST (media \pm error estándar.; n = 10) en el hepatopáncreas de las almejas expuestas a SeMet-25 durante el periodo de exposición.

4.2.3. ACUMULACIÓN DE SELENOMETIONINA EN ALMEJA FINA

4.2.3.1. Selenio total

➤ *Acumulación de Se en el cuerpo completo*

Los resultados de selenio total en el cuerpo completo de las almejas expuestas a SeMet en un rango de concentraciones comprendido entre 5 y 50 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ durante 120 días, mostraron una acumulación acusada en todas las concentraciones estudiadas (Figura 4.31), observándose un comportamiento cinético de primer orden, con coeficientes de correlación superiores a 0,987 y obteniéndose las constantes de absorción, depuración y los factores de bioconcentración como se muestra en la Tabla 4.8

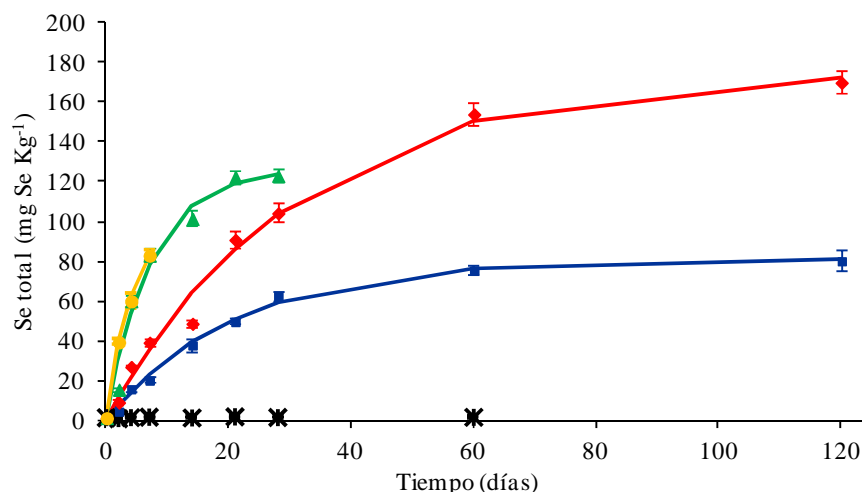


Figura 4.31. Concentración de selenio (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en el cuerpo completo de las almejas durante el periodo de exposición a SeMet desde el agua de cultivo (* $0 \mu\text{g Se L}^{-1}$, ■ $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$, ◆ $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$, ▲ $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$; ● $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$)

Los resultados de los BCFs muestran una disminución significativa cuando aumenta la concentración de SeMet en el agua de cultivo (ANOVA, $p = 0,0001$), siendo menor esta disminución entre las dosis más bajas (SeMet 5 y $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$).

La constante de absorción también presentó una disminución significativa cuando aumenta la concentración de SeMet en el agua de cultivo (ANOVA, $p = 0,00014$), en cambio la constante de eliminación aumentó significativamente con la concentración de SeMet en el medio (ANOVA, $p = 0,00002$).

Además, en todas las concentraciones, la relación entre las constantes de acumulación y eliminación presentaron diferencia significativa (ANOVA, $p < 0,0027$), siendo la K_u mayor que la K_d , disminuyendo la relación desde 16 a 2 veces cuando aumenta la concentración de selenio en medio.

Tabla 4.8. Coeficientes cinéticos (\pm desviación estándar) para *Ruditapes decussatus* durante el periodo de exposición (120 días) a varias concentraciones de SeMet desde el agua de cultivo. (K_u : constante de absorción; K_d : constante de eliminación).

Concentración de exposición ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	BCF	K_d (día^{-1})	K_u ($\text{L} \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	Coefficiente correlación (R)
5	16258 ± 720	$0,047 \pm 0,006$	$0,767 \pm 0,067$	0,998
10	17640 ± 376	$0,032 \pm 0,002$	$0,563 \pm 0,021$	0,994
25	5110 ± 115	$0,135 \pm 0,006$	$0,691 \pm 0,013$	0,987
50	2092 ± 256	$0,232 \pm 0,046$	$0,478 \pm 0,045$	0,998

En general, se observó un incremento en el contenido de Se en el cuerpo completo de las almejas cuando incrementa la concentración de selenometionina en el agua durante siete días de exposición (Figura 4.32), ajustándose a una ecuación de segundo grado ($R=0,997$):

$$C_{org} = -0,2982 + 4,8432 C_{agua} - 0,0633 C_{agua}^2$$

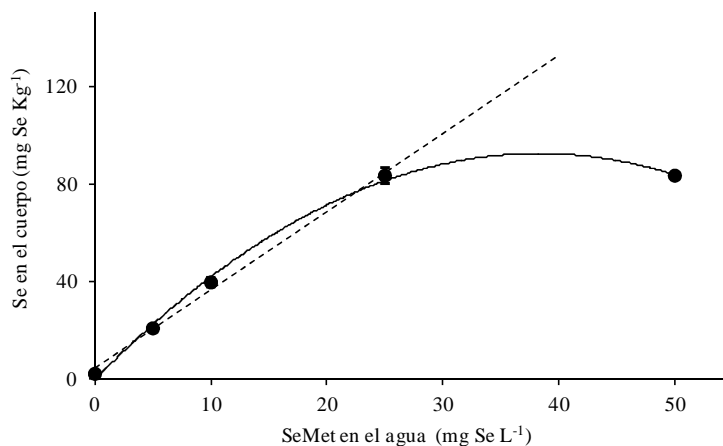


Figura 4.32. Relación entre la concentración de Se en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenometionina en el agua después de 7 días de exposición (Gráfica de la ecuación de 2º grado: Línea continua; con el incremento lineal: línea discontinua, también representado).

➤ *Distribución del Se en los tejidos*

Cuando se determinó la concentración de selenio total en los distintos tejidos de las almejas se observó el mismo comportamiento que para el cuerpo completo, es decir, se ajustaba a un modelo cinético de primer orden, $R > 0,978$ (Tabla 4.9 y Figura 4.33).

Tabla 4.9. Coeficientes cinéticos (\pm desviación estándar) en los tejidos para los experimentos de acumulación en *Ruditapes decussatus* expuesto a varias concentraciones de SeMet durante 120 días (K_u: constante de absorción; K_d: constante de eliminación).

Concentración de exposición ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	BCF	K _d (día ⁻¹)	K _u (L·día ⁻¹ ·g ⁻¹)	Coefficiente Correlación (R)
Pie				
5	13351 \pm 205	0,045 \pm 0,003	0,601 \pm 0,031	0,998
10	8964 \pm 17	0,041 \pm 0,001	0,364 \pm 0,003	0,995
25	3097 \pm 58	0,143 \pm 0,010	0,442 \pm 0,026	0,981
Manto				
5	13931 \pm 602	0,044 \pm 0,003	0,6130 \pm 0,015	0,994
10	11304 \pm 302	0,035 \pm 0,001	0,396 \pm 0,003	0,992
25	3097 \pm 580	0,143 \pm 0,010	0,442 \pm 0,026	0,981
Vísceras				
5	17097 \pm 145	0,048 \pm 0,004	0,818 \pm 0,066	0,997
10	14964 \pm 372	0,035 \pm 0,002	0,522 \pm 0,022	0,988
25	4310 \pm 127	0,157 \pm 0,014	0,674 \pm 0,046	0,978
Branquias				
5	17032 \pm 562	0,047 \pm 0,001	0,807 \pm 0,027	0,997
10	33737 \pm 872	0,036 \pm 0,002	1,205 \pm 0,049	0,991
25	10983 \pm 201	0,133 \pm 0,005	1,458 \pm 0,031	0,987
Hepatopáncreas				
5	32615 \pm 1154	0,049 \pm 0,004	1,593 \pm 0,083	0,995
10	40147 \pm 812	0,037 \pm 0,001	1,502 \pm 0,057	0,994
25	10654 \pm 530	0,125 \pm 0,005	1,329 \pm 0,005	0,985

Los resultados mostraron diferencias significativas en los BCFs para las concentraciones de SeMet (ANOVA, $p=0,0001$), siendo la SeMet acumulada por los distintos tejidos en el siguiente orden:

$$\text{Manto} = \text{Pie} < \text{Vísceras} < \text{Branquias} < \text{Hepatopáncreas}$$

Así mismo, y como en el cuerpo completo, la constante de acumulación disminuyó y la constante de eliminación aumentó en todos los tejidos con la concentración de SeMet en el medio, manteniéndose la constante de acumulación en todos los tejidos y concentraciones de SeMet mayor respecto a la constante de eliminación, siendo esta relación mayor en branquia y hepatopáncreas que en el resto de los tejidos (disminuyendo desde 40 a 10 veces y de 17 a 3 veces con el aumento de SeMet en el medio, respectivamente),

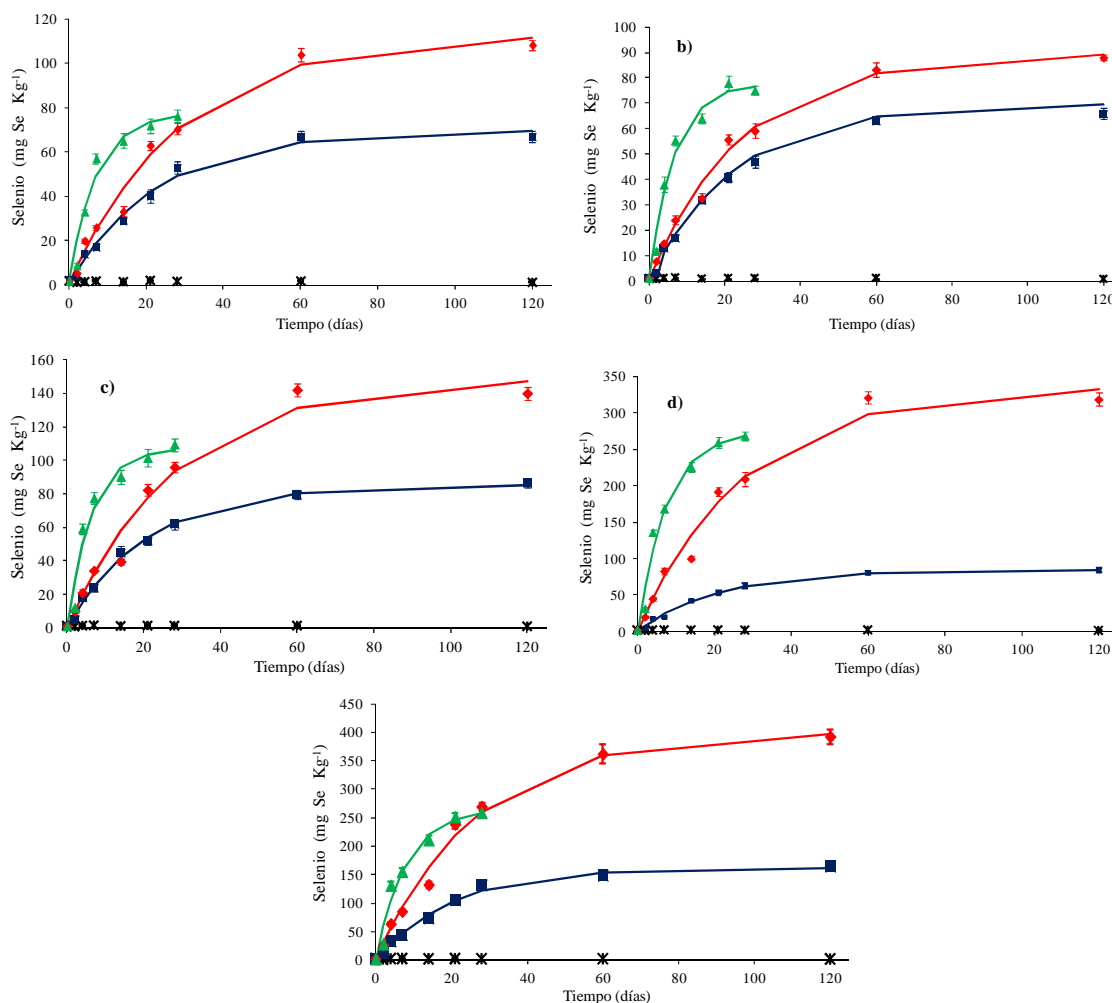


Figura 4.33. Concentración de selenio (mg Se Kg⁻¹; peso seco) en los tejidos de las almejas durante el experimento de acumulación de SeMet con distintas concentraciones; a) Manto; b) Pie; c) Visceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas. (* 0 µg Se L⁻¹; ■ 5 µg Se L⁻¹; ◆ 10 µg Se L⁻¹; ▲ 25 µg Se L⁻¹)

Por otra parte, la suma de la concentración de selenio en los distintos tejidos con respecto a la concentración de selenio en el cuerpo completo, expresado en porcentaje, se encontró entre el 96 y 109 %, teniendo en cuenta para realizar el cálculo el porcentaje en peso que representa cada tejido en la almeja, como se explicó en el *Apartado 3.3.1.1* del Capítulo de Material y Métodos.

En general, se observó un incremento en el contenido de Se en los tejidos de las almejas cuando incrementa la concentración de selenometionina en el agua durante siete días de exposición (Figura 4.34), ajustándose a una ecuación lineal a los 7 días (R=0.975).

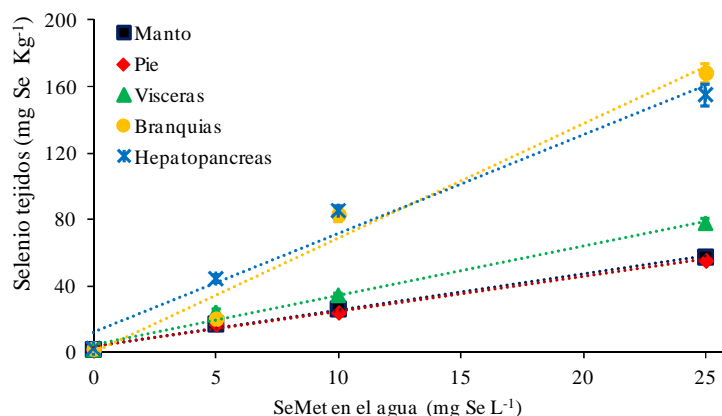


Figura 4.34 Relación entre la concentración de Se en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenometionina en el agua después de 7 días de exposición.

➤ *Distribución subcelular del Se en los tejidos*

La separación subcelular se llevó a cabo en almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet durante 21 y 30 días, tanto en hepatopáncreas como en branquias. Los resultados mostraron recuperaciones en el fraccionamiento subcelular del tejido con respecto a su concentración total del 90 y 106% para hepatopáncreas y el 94% y 113 % para branquias (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Concentración (mg Se Kg^{-1} , peso seco) de selenio total y la distribución en las fracciones biológicamente activa, detoxificada núcleos y desechos celulares, en hepatopáncreas y branquias, de almejas expuestas con $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet durante 21 y 30 días

	Hepatopáncreas		Branquias	
	21 días	30 días	21 días	30 días
Se total	238	269	192	209
Distribución de selenio				
Se activo biológicamente	26,5	66,7	9,7	38,4
Se detoxificado biológicamente	85,8	107	79,0	161
Núcleos y desechos celulares	103	111	91,0	37,4

En hepatopáncreas, entre el 12% y el 23% del contenido de selenio se encontró biológicamente activo, mientras que en branquias fue entre 5% y 16%. La mayor parte del selenio, en ambos tejidos, se encontró en las fracciones biológicamente detoxificadas y en los núcleos y desechos celulares (76-96%), mayoritariamente en proteínas estables y núcleos y desechos celulares (Figura 4.35).

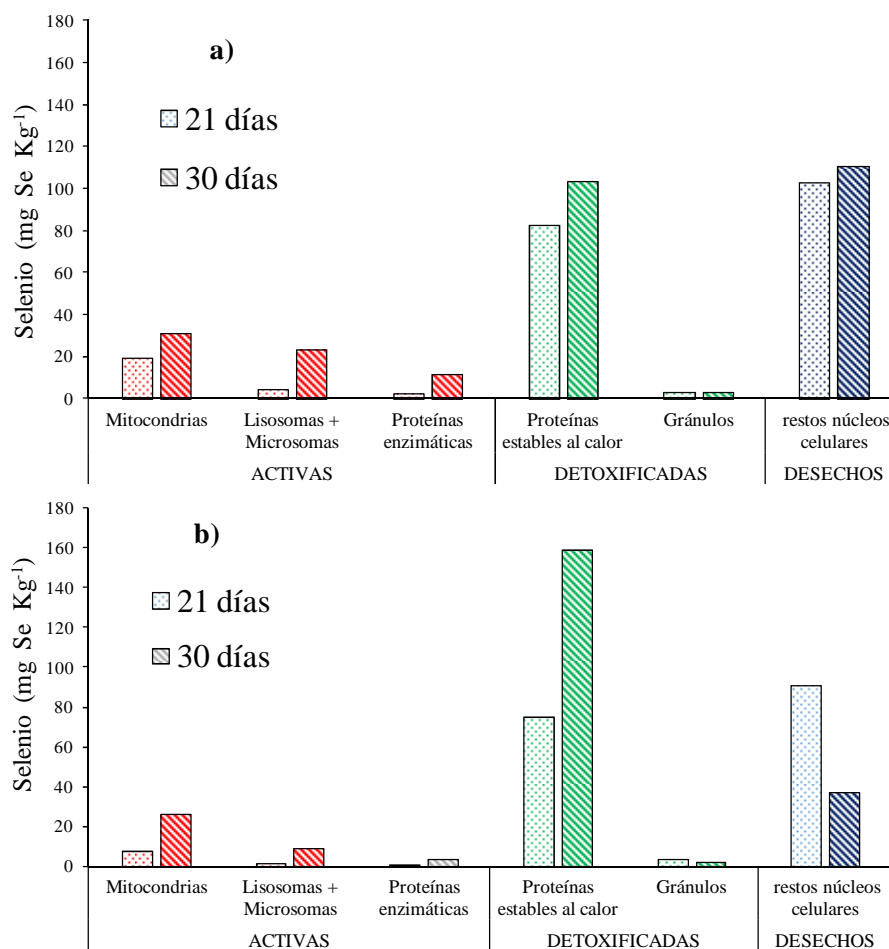


Figura 4.35. Concentración de selenio (mg Se Kg⁻¹, peso seco) en las distintas fracciones de la separación subcelular en órganos de almejas expuestas con 10 µg Se L⁻¹ de SeMet durante 21 y 30 días: a) hepatopáncreas; b) branquias

4.2.3.2. Especiación de selenio en almeja fina cultivada con selenometionina

Los resultados de especiación en los extractos de hidrólisis enzimática con proteasa/lipasa, tanto en el cuerpo completo como en los tejidos, de las almejas expuestas a distintas concentraciones de SeMet a través del agua durante 120 días con renovación diaria, mostraron la presencia de distintas especies de selenio (Figura 4.36). Las especies identificadas mediante el acoplamiento instrumental HPLC-UV-TR-HG-AFS por intercambio aniónico fueron SeCys₂, SeMetSeCys y SeMet y no se detectó ninguna especie desconocida, mientras que por intercambio catiónico se identificaron SeMetSeCys y SeMet y cuatro especies no identificadas (U1, U2, U3 y U4 que eluyeron a 5,7; 9,4; 11,5 y 23,1 min).

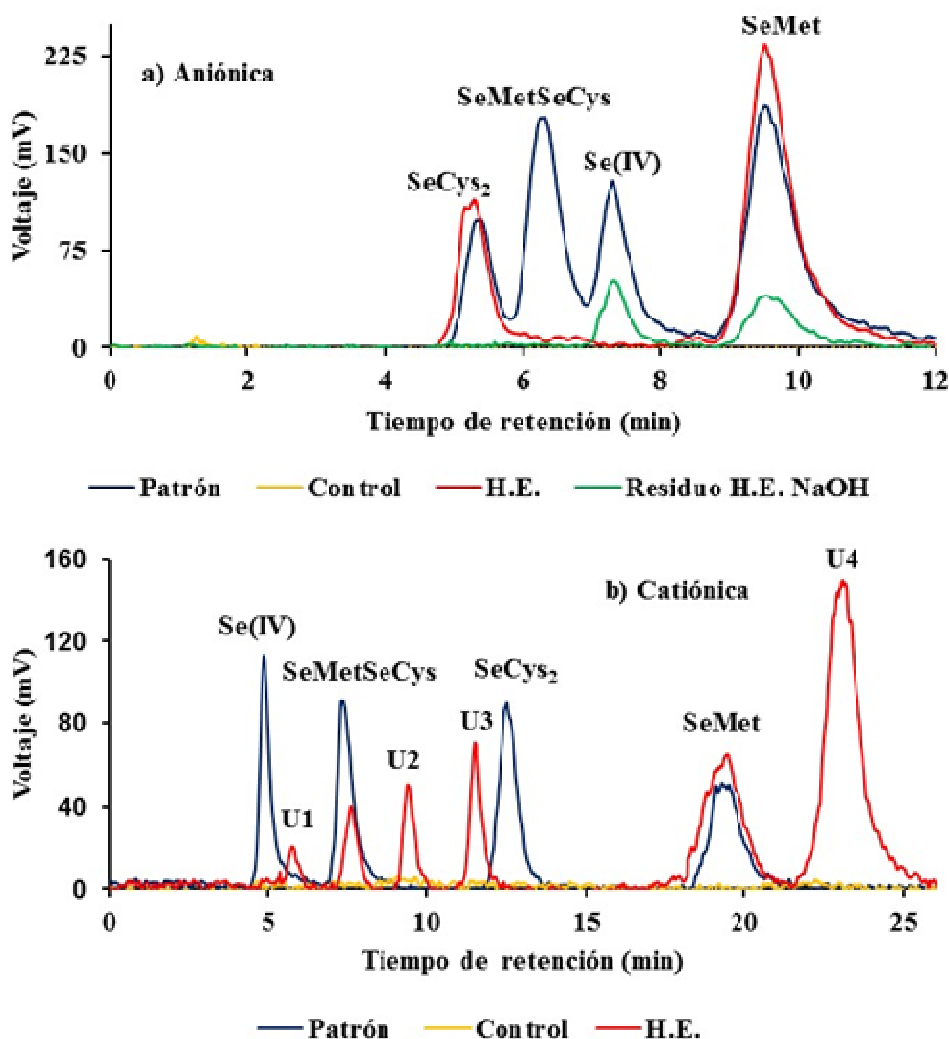


Figura 4.36. Cromatogramas de especies de selenio en el cuerpo completo de almejas cultivadas con $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet durante 21 días mediante extracción secuencial de proteasa/lipasa y NaOH 0,02 M con HPLC-UV-TR-HG-AFS: a) Intercambio aniónico; b): intercambio catiónico (H.E.: hidrólisis enzimática; U_n: especies de selenio desconocidas)

Por intercambio catiónico, no se observó pico al tiempo de elución de la SeCys₂, mientras que por intercambio aniónico esta especie eluye en el tiempo muerto y, por lo tanto, puede ser otra especie de selenio.

En el caso de la SeMet, la concentración de SeMet en los extractos por intercambio aniónico fueron mayores que por intercambio catiónico, esta discrepancia podría deberse a que por intercambio aniónico se eluyan otras especies al mismo tiempo que la SeMet, por lo tanto se utilizó una técnica alternativa para cuantificar la SeMet basada en el acoplamiento instrumental BSE-TD-GC-MS, confirmando que la concentración de SeMet obtenida por cromatografía de intercambio aniónico estaba sobreestimada.

En cuanto al residuo de la hidrólisis enzimática tratado con hidróxido sódico, mediante el acoplamiento HPLC-UV-TR-HG-AFS por intercambio aniónico, se observó la presencia de Se(IV) y SeMet.

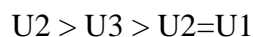
El porcentaje de especies de selenio identificadas con respecto a la concentración de selenio presente en el cuerpo completo y en los tejidos expuestos a distintas concentraciones de SeMet, se encontró entre 31 y 66%, indicando que un porcentaje alto de las especies presentes en los extractos fueron desconocidas.

➤ ***Especiación de selenio en el cuerpo completo***

En la Figura 4.37 se muestra como varió la concentración de las especies de selenio en el cuerpo completo con el tiempo de exposición. La concentración de las especies conocidas en los tejidos de almeja incrementa en el siguiente orden:



Mientras que para las especies desconocidas incrementa en el orden:



Las concentraciones de las especies de selenio se ajustan a modelos cinéticos de primer orden con $R > 0,737$.

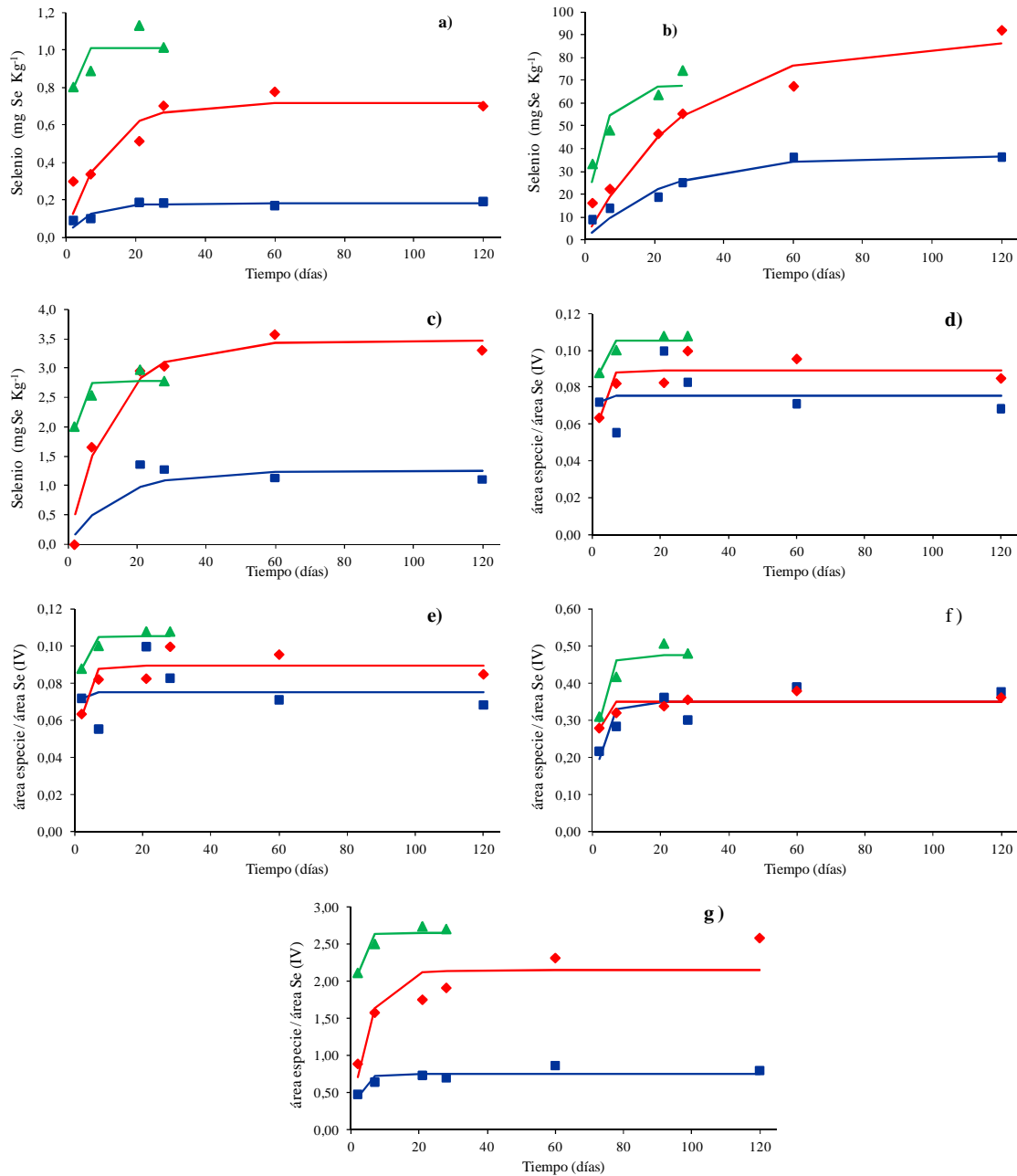


Figura 4.37. Concentración de especies de selenio (conocidas: mg Se Kg⁻¹, peso seco; desconocidas: área especie / área Se(IV)) en los tejidos de almejas mediante HPLC-TR-UV-HG-AFS durante el experimento de acumulación de SeMet con distintas concentraciones: a) Se(IV); b) SeMet; c) SeMetSeCys; d) Compuesto desconocido U1; e) Compuesto desconocido U2; f) Compuesto desconocido U3; g) Compuesto desconocido U4. (■ 5 µg Se L⁻¹, ◆ 10 µg Se L⁻¹; ▲ 25 µg Se L⁻¹)

➤ *Especiación de selenio en los tejidos*

La especiación en los distintos tejidos de las almejas se llevó a cabo en el grupo de almejas cultivadas en presencia de 10 µg Se L⁻¹ de SeMet a 14, 30 y 60 días de exposición.

Las especies presentes fueron las mismas que para el cuerpo completo, siendo la SeMet (98%) y U4 (65%), las especies que se encontraron en mayor concentración dentro de las especies conocidas y desconocidas, respectivamente. De forma similar que en el caso de selenio total en los tejidos, el pie y el manto fueron los tejidos que presentaron menor concentración de especies, mientras que la mayor la presentaron branquias y hepatopáncreas, como se puede comprobar en la Figura 4.38.

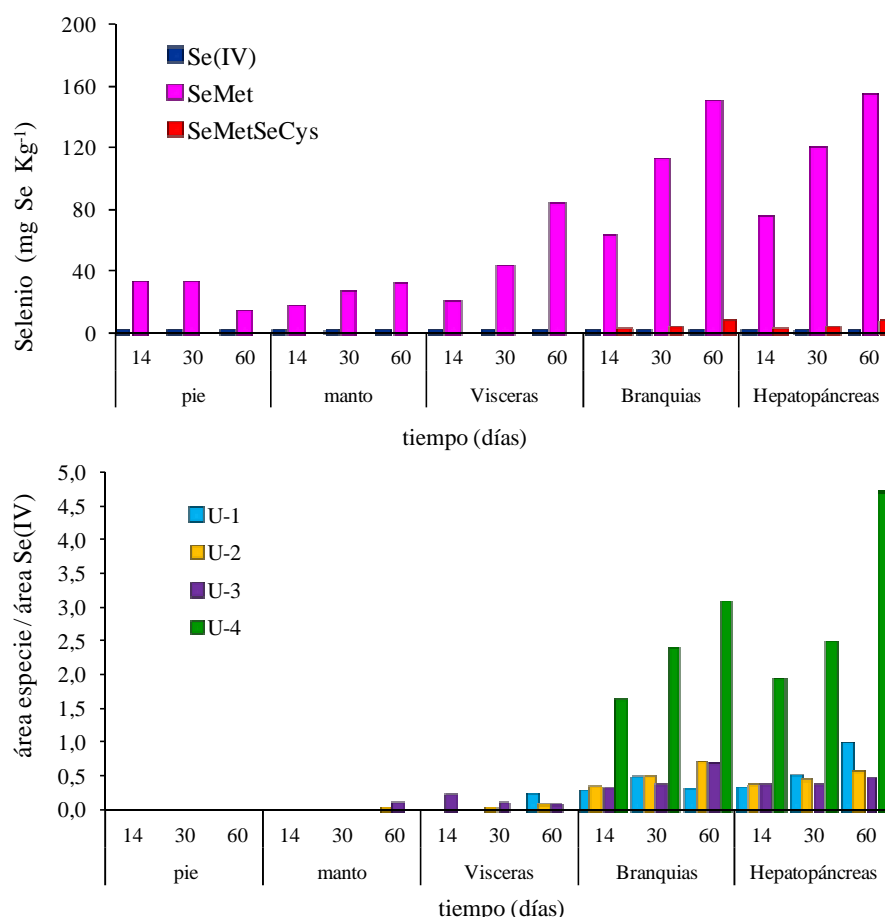


Figura 4.38. Concentración de especies de selenio (conocidas: mg Se Kg⁻¹, peso seco; desconocidas: área especie / área Se(IV)) en los distintos tejidos de las almejas expuestas a 10 µg de Se L⁻¹ de SeMet

➤ *Distribución subcelular del Se*

La especiación en las distintas fracciones de la separación subcelular se llevó a cabo en las branquias y hepatopáncreas de almejas expuestas a 10 µg Se L⁻¹ de SeMet durante 14 días, las especies identificadas fueron Se(IV), SeMet y U4 (Figura 4.39).

En la branquias, el Se(IV) se encontró principalmente en los núcleos y desechos celulares, mientras que la SeMet y la especie desconocida U2 en la fracción de proteínas estables al calor (fracción biológicamente inactiva).

En el hepatopáncreas, el Se(IV) se encontró principalmente en los desechos celulares y núcleos, mientras que el 76% de la SeMet se encontró en la fracción de proteínas estables al calor (fracción biológicamente inactiva) y el 24 % en la fracción biológicamente activa (mitocondrias y proteínas enzimáticas), encontrándose la especie desconocida en la fracción biológicamente activa.

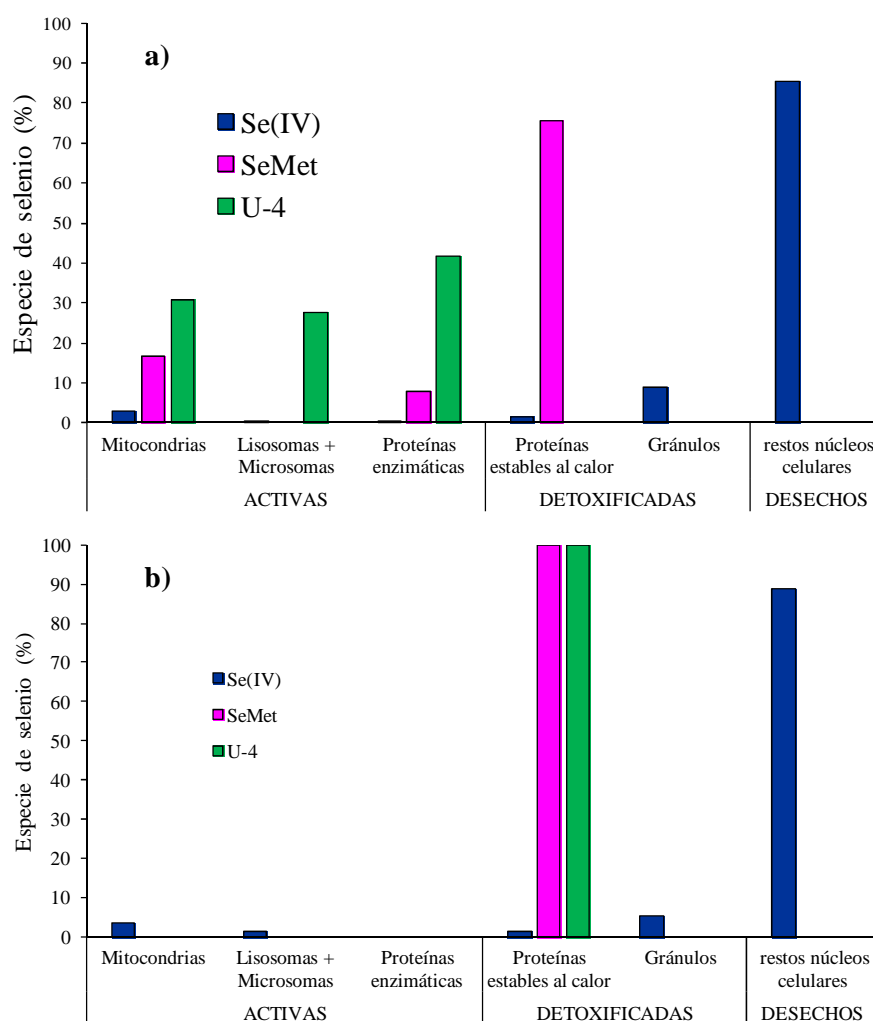


Figura 4.39. Especies de selenio (%) extraídas en las fracciones subcelulares de almejas expuestas a $10 \mu\text{g}$ de Se L^{-1} de SeMet durante 14 días mediante hidrólisis enzimática-NaOH y HPLC-TR-UV-HG-AFS: a) hepatopáncreas y b) branquias

4.2.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENOMETIONINA EN LAS ALMEJAS

El grupo de almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet durante 60 días, posteriormente se mantuvo en sustratos de arena con agua de mar en circuito abierto durante 60 días para llevar a cabo un estudio de eliminación. Durante este experimento, se estudió el grado de

enterramiento de las almejas y la mortalidad. Los resultados se muestran en la Figura 4.40 donde se puede observar que la TE50 se alcanzó entre las 48-72 horas.

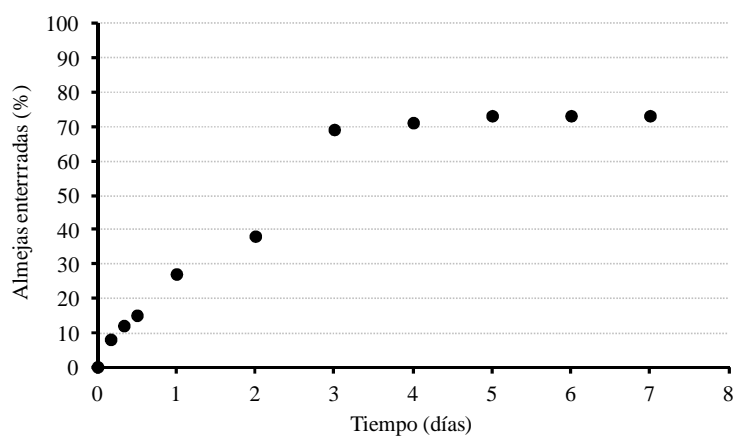


Figura 4.40. Evolución del enterramiento de las almejas (%) durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber estado expuestas durante 60 días a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet

En cuanto a la supervivencia, en la Figura 4.41 se puede observar la evolución a lo largo de la primera semana del ensayo de depuración, en la que se aprecia una alta mortalidad a las 72 h, comenzando de nuevo a partir del día cinco, alcanzando un 85% el séptimo día.

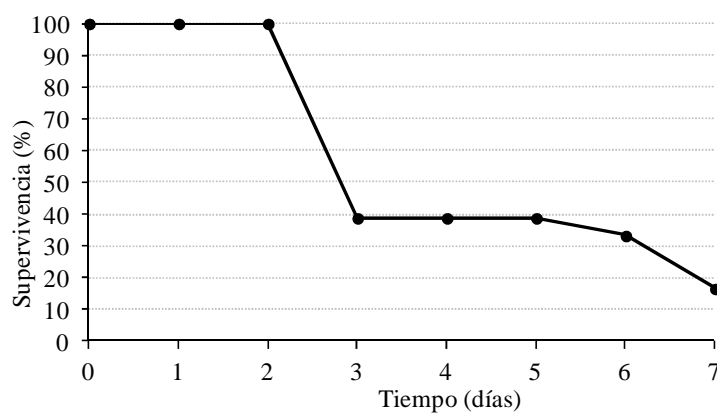


Figura 4.41. Evolución de la supervivencia de las almejas (%) durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber estado expuestas durante 60 días a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet

➤ *Eliminación del Se en el cuerpo completo*

Los resultados de la eliminación de SeMet en el cuerpo completo de la almeja siguieron una curva exponencial con respecto al tiempo, siendo la concentración final de selenio de alrededor de $23,8 \pm 2,4 \text{ mg Se Kg}^{-1}$ (en peso seco) (Figura 4.42) y ajustándose a cinéticas de primer orden.

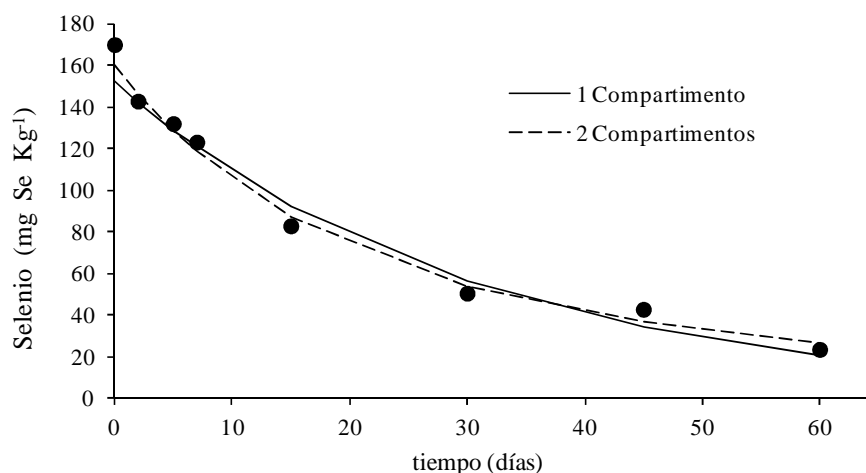


Figura 4.42. Comparación del contenido de Se observado (●) y predicho en las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento y 2 compartimentos (mg Se Kg⁻¹, peso seco).

Los resultados mostraron que la concentración de selenio predicha no difiere significativamente de las concentraciones observadas usando modelos cinéticos de uno y dos compartimentos, con coeficientes de correlación de 0,992 y 0,996 respectivamente, y no llegando al estado estacionario. El tiempo de vida media biológica ($t_{1/2}$) fue de 19 y 10 días para los modelos cinéticos de 1 y 2 compartimentos, respectivamente, siendo necesarios 46 días para llegar al estado estacionario, indicando la gran persistencia del selenio en las almejas (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Coeficientes cinéticos para los experimentos de depuración de SeMet en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg⁻¹); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días⁻¹); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[Se]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg⁻¹))

$[Se]_i$	1 Compartimento		2 Compartimentos	
32,6	A	152	A₁	104
	K_d	0,033	K_{d1}	0,1612
	t_{1/2}	19	(t_{1/2})₁	10
	R	0,991	A₂	56,4
			K_{d2}	0,0140
			(t_{1/2})₂	46
			R	0,995

➤ *Eliminación del Se en los tejidos*

El mismo comportamiento se observó en los tejidos de las almejas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.12 y Figura 4.43, y se puede comprobar que el modelo cinético de

dos compartimentos se ajusta mejor a los datos observados, con coeficientes de regresión mayores de 0,991 para todos los tejidos, excepto las vísceras que no se ajustan a este modelo.

Por otra parte, la vida media biológica ($t_{1/2}$) es mayor en el modelo cinético de un compartimento para todos los tejidos, excepto para las vísceras, encontrándose el valor de la vida media en el rango comprendido entre 16 y 23 días, indicando la gran persistencia del selenio en los tejidos de las almejas.

Cuando se usa el modelo cinético de dos compartimentos, al principio se observa una eliminación rápida de la SeMet, entre 2 y 6 días para todos los tejidos, excepto las vísceras, y posteriormente, la eliminación es lenta, llegando hasta 106 días para el manto.

Tabla 4.12. Coeficientes cinéticos para el manto, pie, vísceras, branquias y hepatopáncreas durante el experimento de depuración de la selenometionina en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}); (-): no se ajusta al modelo cinético))

	Manto	Pie	Vísceras	Branquias	Hepatopáncreas
<i>1 compartimento</i>					
$[\text{Se}]_i$	108	88	140	318	392
A	97	73	127	260	321
K_d	0,071	0,030	0,036	0,027	0,040
t_{1/2}	17	21	17	23	16
R	0,966	0,953	0,994	0,963	0,941
<i>2 compartimentos</i>					
$[\text{Se}]_i$	108	88	–	318	392
A₁	86	52	–	143	278
K_{d1}	0,105	0,301	–	0,200	0,245
(t_{1/2})₁	6	2	–	3	3
A₂	30	43	–	186	183
K_{d2}	0,006	0,019	–	0,017	0,020
(t_{1/2})₂	106	33	–	37	33
R	0,999	0,994	–	0,990	0,991

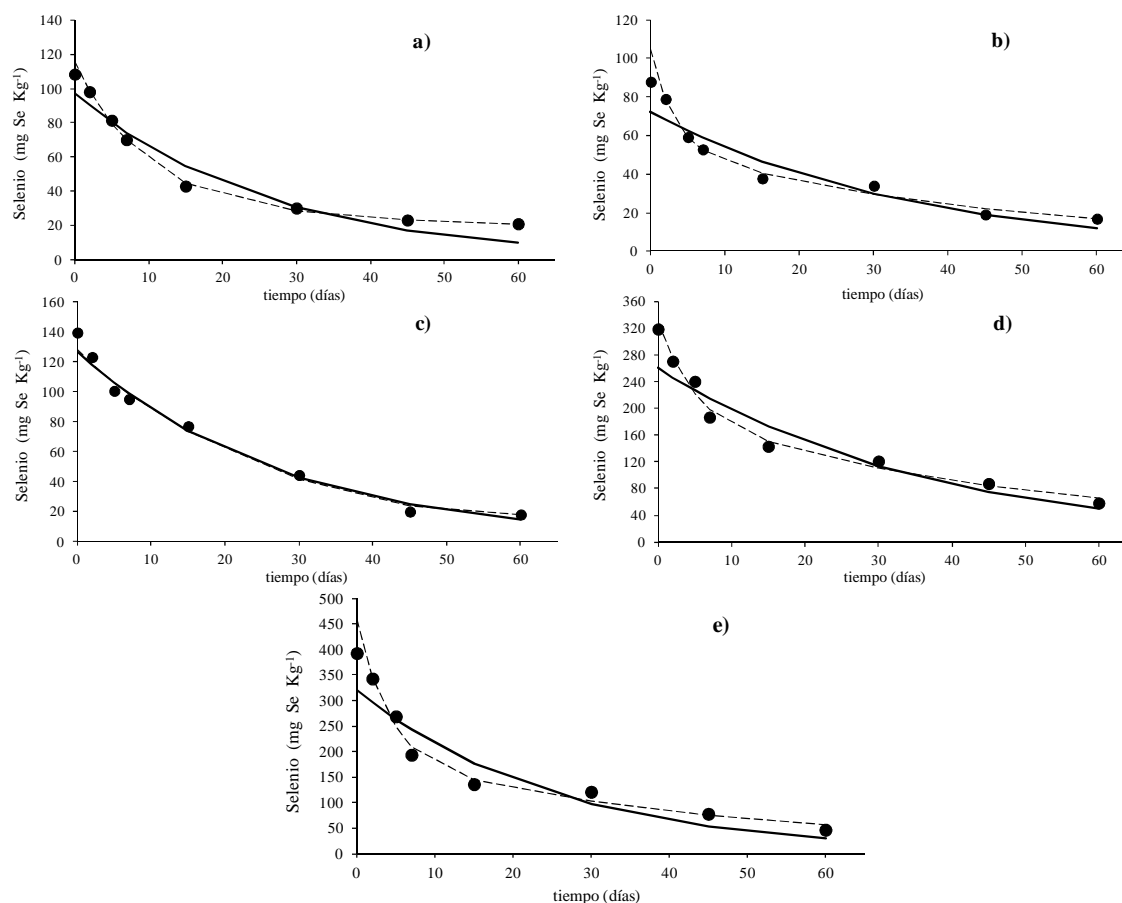


Figura 4.43. Comparación del contenido de Se observado (●) y predicho en los tejidos de las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua): a) Manto; b) Pie; c) Vísceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas. (mg Se Kg⁻¹, peso seco).

➤ *Especiación del Se*

Por último, se determinaron las especies de selenio presentes en el cuerpo completo, y encontrándose las mismas especies que en acumulación, Se(IV), SeMetSeCys, SeMet y cuatro especies desconocidas U1, U2, U3 y U4.

Los resultados para todas las especies, tanto identificadas como desconocidas, se ajustaron a un modelo cinético de primer orden (Tabla 4.13 y Figura 4.44). El tiempo de vida media indica que la eliminación de las especies siguió este orden:

$$\text{SeMetSeCys} < \text{U4} < \text{U1} < \text{U2} < \text{SeMet} < \text{Se(IV)} = \text{U3}$$

Tabla 4.13. Coeficientes cinéticos para las especies presentes durante el experimento de depuración del selenito en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

	Se(IV)	SeMetSeCys	SeMet	U1*	U2*	U3*	U4*
<i>1 compartimento</i>							
[Se] _i	0,773	3,58	67,1	0,095	0,418	0,379	2,31
A	0,821	3,44	71,4	0,097	0,425	0,369	2,23
K _d	0,237	0,038	0,135	0,812	0,090	0,250	0,063
t _{1/2}	3	17	5	8	7	3	10
R	0,959	0,944	0,960	0,990	0,992	0,992	0,994
<i>2 compartimentos</i>							
[Se] _i	0,776	3,58	67,1	0,095	0,418	0,379	2,31
A ₁	0,460	0,003	35,38	-15,63	0,00002	0,405	0,99
K _{d1}	0,237	-0,17	0,135	0,153	-0,234	0,250	0,143
(t _{1/2}) ₁	3	0	5	4	0	3	4
A ₂	0,36	3,61	36,02	15,72	0,431	-0,037	1,31
K _{d2}	0,237	0,05	0,135	0,152	0,096	0,250	0,037
(t _{1/2}) ₂	3	13	5	4	7	3	17
R	0,959	0,974	0,975	0,996	0,996	0,992	0,999

* Área relativa con respecto a Se(IV)

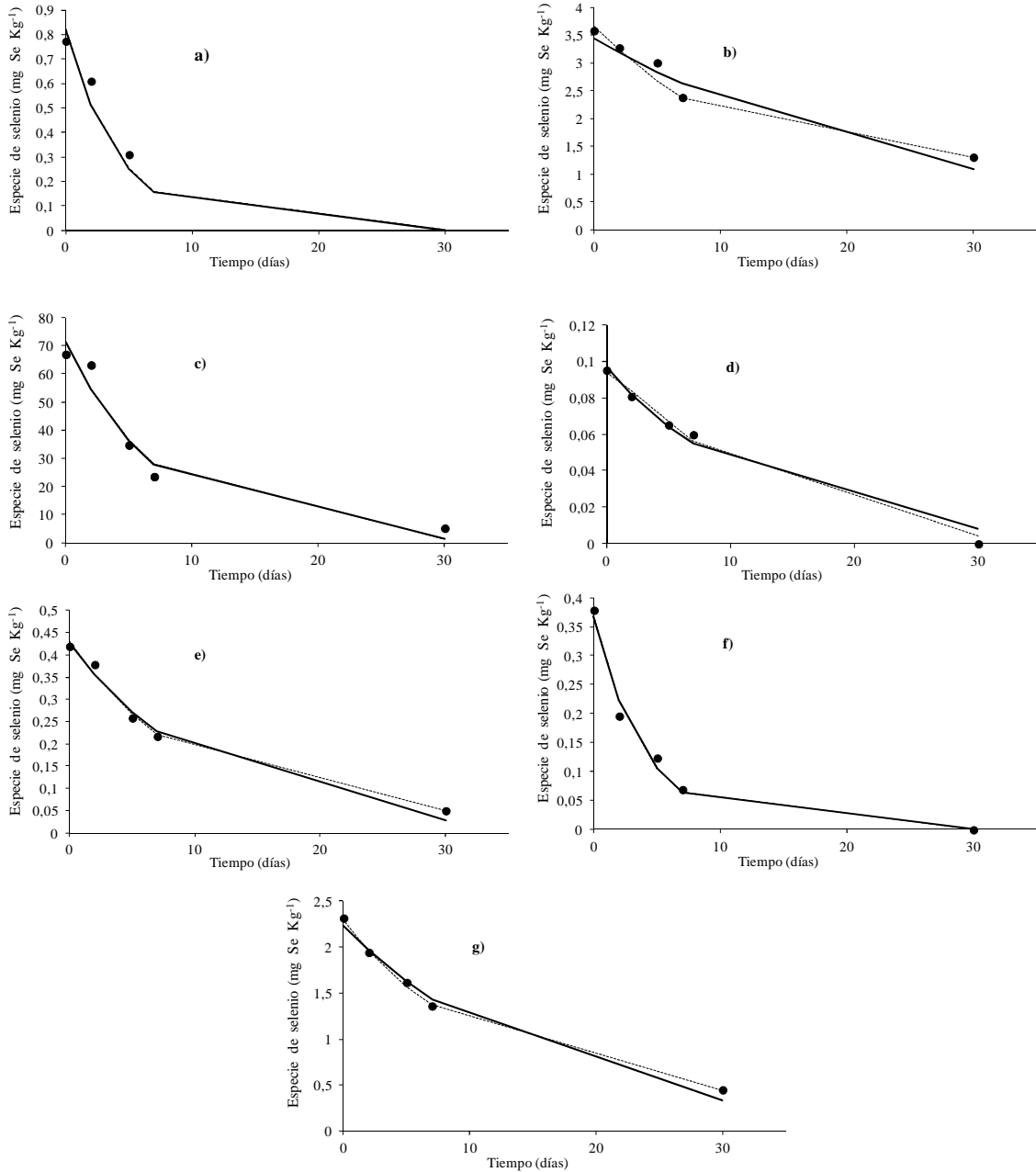


Figura 4.44. Comparación del contenido de especies de Se observado (●) y predicho en las almejas durante el experimento de depuración, mediante el uso de los modelos de cinéticos de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua): a) Se(IV); b) SeMetSeCys; c) SeMet; d) U1 d) U2; e) U3; f) U4

4.3. SELENOMETILSELENOCISTEINA A TRAVÉS DEL MEDIO ACUÁTICO

4.3.1. MORTALIDAD

Los resultados de mortalidad de las almejas expuestas a distintas concentraciones de SeMetSeCys mostraron mortalidad del 100% en el grupo de almejas expuesta a 25 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys en el agua a los 21 y 49 días respectivamente (Figura 4.45).

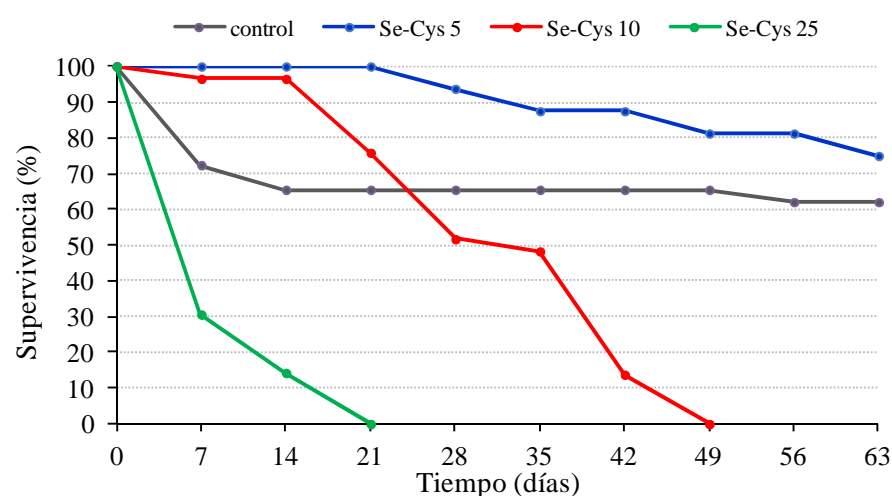


Figura 4.45. Evolución de la supervivencia acumulada en las almejas expuestas a distintas dosis de SeMetSeCys a través del agua

Las almejas expuestas a la concentración de 5 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys tenían una supervivencia del 75% a los 60 días de cultivo, y sobrevivieron hasta el final del periodo de exposición (120 días) al igual que el control.

4.3.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

4.3.2.1. Tasa de aclaramiento (TA)

Respecto a la tasa de aclaramiento, no se observaron diferencias significativas en el grupo de almejas expuestas a 5 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys (ANOVA, $p > 0,875$) con respecto al control, mientras que para el grupo de almejas expuestas a 10 y 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys se observó una disminución de un 30 y 46% a los 28 y 14 días, respectivamente, con respecto al control (ANOVA, $p < 0.021$) (Figura 4.46).

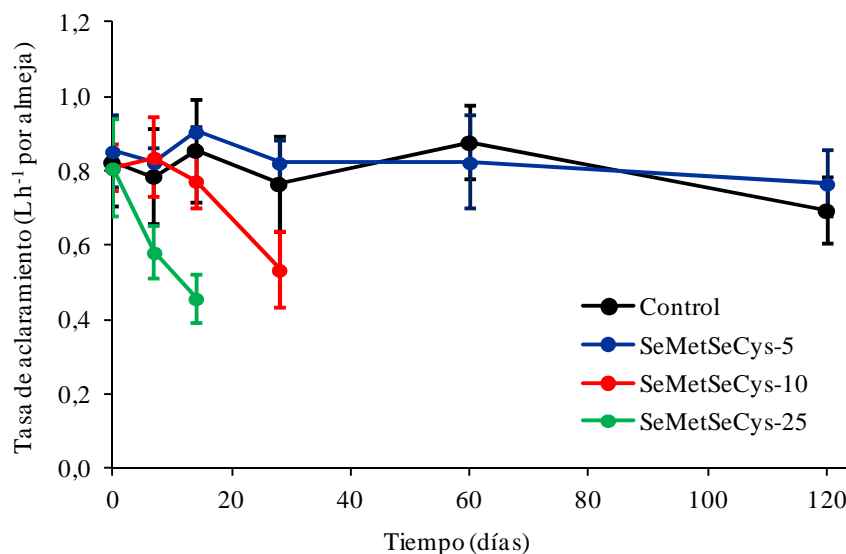


Figura 4.46. Evolución de la tasa de aclaramiento en almejas expuestas a distintas dosis de SeMetSeCys en el agua durante 120 días

La tasa de aclaramiento de la SeMetSeCys-25 disminuyó a los 14 días, momento en el solo sobrevivían un 30%, lo que denota que estaban ya muy afectadas por el selenio.

4.3.2.2. Actividad enzimática

Se analizaron las variaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GPx dependiente de Se y GST, así como en el nivel de peroxidación lipídica (LPO), como consecuencia del estrés oxidativo en las almejas por la exposición a SeMetSeCys en el agua de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que el control no presentó diferencia significativa en el periodo del ensayo (test t, $p=0.334$). El ensayo con SeMetSeCys a concentraciones de $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ tuvo una alta mortalidad, por lo que se ha tratado estadísticamente por separado

En branquia, las almejas expuestas a SeMetSeCys no mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática respecto al control para ninguna de las enzimas testadas.

En hepatopáncreas, tampoco mostraron diferencias en la actividad GPx y LPO respecto al control. La actividad GPx-Se presentó diferencias significativas respecto a la SeMetSeCys a los 30 días de exposición (ANOVA, $p=0.0257$), mostrando una mayor actividad enzimática en las almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys respecto al control y a la dosis de $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys (análisis post-hoc de Duncan) (Figura 4.47)

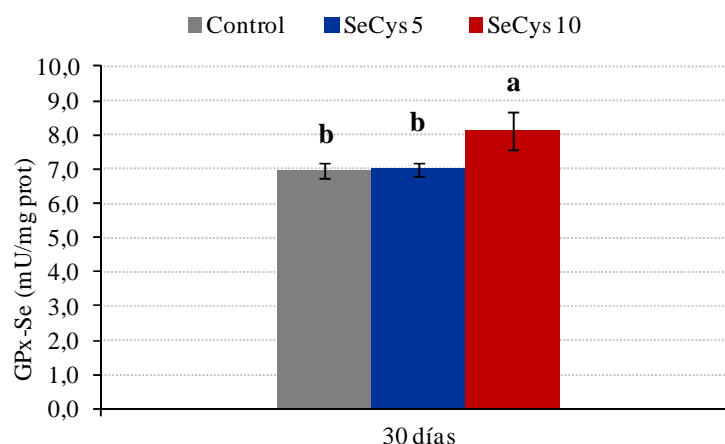


Figura 4.47. Actividad GPx-Se (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas de los grupos expuestos a los 30 días de exposición a SeMetSeCys 5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ y el control

La actividad GST en el hepatopáncreas presentó diferencias significativas respecto a la SeMetSeCys (ANOVA, $p=0.001$), siendo, según los resultados del test post-hoc de Tukey, la actividad similar entre los individuos tratados con SeMetSeCys (5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) y, al mismo tiempo, su actividad menor respecto al control (Figura 4.48).

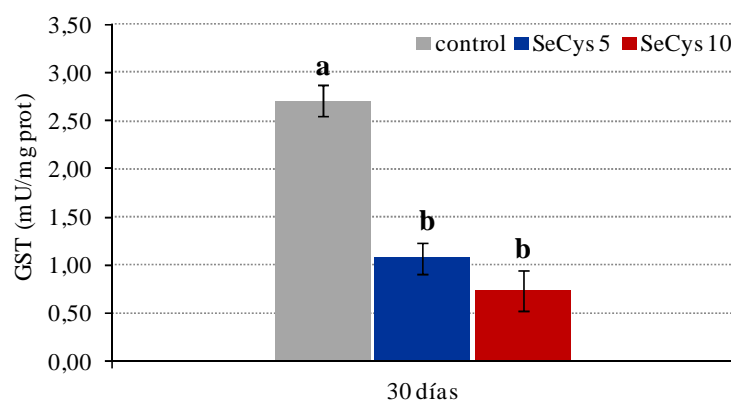


Figura 4.48. Actividad GST (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas de los grupos expuestos a los 30 días de exposición a SeMetSeCys 5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ y el control

La actividad enzimática en branquia del grupo expuesto a 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys no presentó diferencias significativas a lo largo del periodo de exposición en ninguna de las enzimas estudiadas, así mismo, en hepatopáncreas, no presentó diferencias en la actividad de GPx y LPO, mientras que la actividad GPx-Se y GST de este grupo fue diferente significativamente (ANOVA, $p=0,026$ y ANOVA, $p=0.001$, respectivamente) a lo largo del periodo de exposición, confirmándose los mismos resultados que para el resto de tratamientos con SeMetSeCys, una mayor actividad GPx-Se en las almejas expuestas a 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys respecto al control y a la dosis de 5 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys

(análisis post-hoc de Duncan), y la actividad GST similar entre los individuos tratados con SeMetSeCys (5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$) y, al mismo tiempo, su actividad menor respecto al control.

4.3.3. ACUMULACIÓN DE SELENOMETILSELENOCISTEINA

4.3.3.1. Selenio total

➤ *Acumulación de Se en el cuerpo completo*

Los resultados de selenio total en el cuerpo completo de las almejas expuestas a SeMetSeCys en un rango de concentraciones comprendida entre 5 y 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ durante 120 días se muestran en la Figura 4.49. Para el grupo de almejas expuestas a 5 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys, incrementó la concentración de selenio en el las almejas durante los primeros 14 días, llegando al estado estacionario. En el caso del grupo de almejas expuestas a 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys mostró una acumulación más acusada hasta los 21 días, donde alcanzó el estado estacionario. Y por último, en el grupo de almejas expuestas a 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys, la concentración de selenio incremento rápidamente a las 48 horas y, posteriormente el incremento fue lento hasta llegar a la mortalidad del grupo a los 14 días.

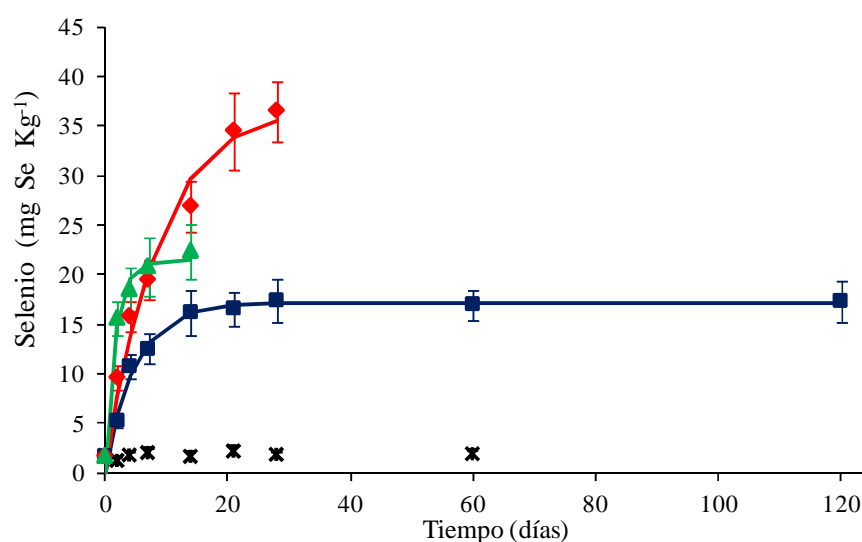


Figura 4.49. Concentración de selenio (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en el cuerpo completo de las almejas durante el experimento de acumulación de SeMetSeCys con renovación diaria (* 0 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, ■ 5 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, ◆ 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$; ▲ 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$)

En general, todas las concentraciones de SeMetSeCys estudiadas mostraron un comportamiento cinético de primer orden, con coeficientes de correlación superiores a

0,989, obteniéndose las constantes de absorción, depuración y los factores de bioconcentración, como se muestra en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Coeficientes cinéticos (\pm desviación estándar) para *Ruditapes decussatus* durante el periodo de exposición (120 días) a varias concentraciones de SeMetSeCys desde el agua de cultivo

Concentración de exposición ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	BCF	Kd (día^{-1})	Ku ($\text{L}\cdot\text{día}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	Coefficiente correlación (R)
5	3460 \pm 296	0,211 \pm 0,024	0,722 \pm 0,071	0,991
10	3683 \pm 584	0,117 \pm 0,024	0,432 \pm 0118	0,989
25	837 \pm 131	0,611 \pm 0,121	0,520 \pm 0,080	0,990

Los resultados de los BCFs mostraron que no existía diferencias significativas en el grupo de almejas expuestas a 5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys (ANOVA, $p=0,306$), mientras que se observó una disminución significativa con 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys en el agua (ANOVA, $p=0,0001$).

Respecto a la constante de absorción, presentó una disminución significativa con el aumento de la concentración de 5 a 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys en el agua (ANOVA, $p<0.0006$), y la constante de eliminación, un aumento significativo con 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys (ANOVA, $p=0,0001$).

La relación entre las constantes Ku y Kd presentó diferencias significativas en los grupos de almejas expuestas a 5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys en el agua (ANOVA, $p<0.00004$), siendo 4 veces mayor la Ku , mientras que no se observó una diferencia significativa con 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys (ANOVA, $p=0,257$).

Por otra parte, la concentración total de selenio en el cuerpo completo incrementó en el contenido de Se de forma lineal cuando aumentaba la concentración en el agua a los 14 días de exposición, ajustándose a una ecuación de segundo grado ($R=0,9981$) (Figura 4.50):

$$C_{\text{Org}} = -0,1097 + 3,5706 C_{\text{agua}} - 0,1097 C_{\text{agua}}^2$$

Con esta ecuación se puede predecir la concentración a la que es necesario exponer a las almejas durante 14 días para obtener una concentración determinada de selenio en el cuerpo completo la almeja, además, se puede observar que los individuos acumulan una

alta concentración de selenio cuando se expone a concentraciones de SeMetSeCys por encima de $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$, alcanzando la saturación.

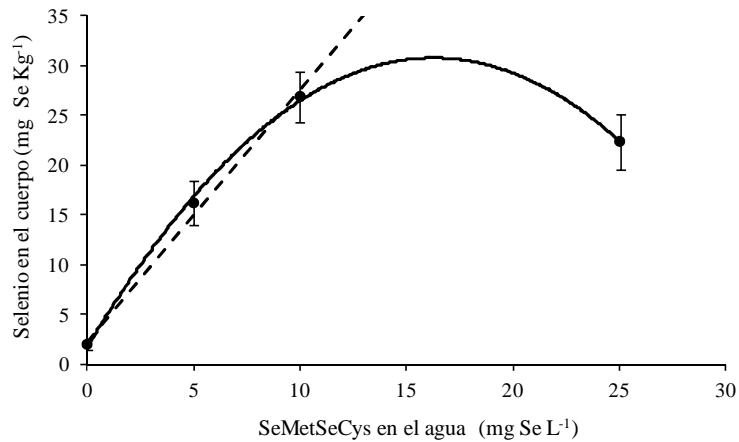


Figura 4.50. Relación entre la concentración de Se en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenometilselenocisteína en el agua después de 14 días de exposición (Gráfica de la ecuación de 2º grado: Línea continua; con el incremento lineal: línea discontinua, también representado).

➤ *Distribución tisular del Se*

En este caso se observó el mismo comportamiento que para el tejido total, ajustándose a un modelo cinético de primer orden ($R > 0,886$) (Tabla 4.15 y Figura 4.51).

Los resultados mostraron diferencias significativas en los BCFs para las concentraciones de SeMetSeCys (ANOVA, $p=0,0001$) y, acumulándose en el siguiente orden en los distintos tejidos:

Manto= Pie < Vísceras < Branquias < Hepatopáncreas

Tabla 4.15. Coeficientes cinéticos (\pm desviación estándar) en los tejidos para los experimentos de acumulación en *Ruditapes decussatus* expuesto a varias concentraciones de SeMetSeCys durante 120 días

Concentración de exposición ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	BCF	K_d (día^{-1})	K_u ($\text{L}\cdot\text{día}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	Coefficiente Correlación (R)
Pie				
5	2053 \pm 368	0,198 \pm 0,041	0,409 \pm 0,080	0,958
10	1480 \pm 230	0,265 \pm 0,052	0,392 \pm 0,070	0,984
25	581 \pm 85	0,492 \pm 0,048	0,292 \pm 0,049	0,980
Manto				
5	1855 \pm 311	0,192 \pm 0,013	0,346 \pm 0,033	0,918
10	998 \pm 137	0,332 \pm 0,079	0,314 \pm 0,048	0,886
25	450 \pm 83	0,423 \pm 0,117	0,190 \pm 0,029	0,893
Vísceras				
5	2649 \pm 365	0,283 \pm 0,013	0,750 \pm 0,115	0,945
10	2596 \pm 378	0,480 \pm 0,106	1,197 \pm 0,023	0,964
25	708 \pm 137	0,840 \pm 0,105	0,586 \pm 0,075	0,981
Branquias				
5	8489 \pm 827	0,454 \pm 0,054	2,551 \pm 0,333	0,923
10	5423 \pm 872	0,225 \pm 0,007	1,224 \pm 0,147	0,998
25	1789 \pm 250	0,578 \pm 0,0120	1,022 \pm 0,225	0,991
Hepatopáncreas				
5	21305 \pm 1953	0,045 \pm 0,005	0,955 \pm 0,042	0,988
10	32704 \pm 4956	0,027 \pm 0,007	0,912 \pm 0,107	0,991
25	2856 \pm 394	0,332 \pm 0,100	0,894 \pm 0,192	0,985

Los BCFs y la tasa de acumulación fueron mayores en hepatopáncreas y branquia. Al igual que en el cuerpo completo, los BCFs presentaron un fuerte descenso con 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys en el agua; la constante de absorción presentó una disminución con el aumento de la concentración de selenio en el agua y la constante de eliminación tuvo un claro aumento con 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys.

La constante K_u fue mayor que la K_d en los grupos de almejas expuestas a 5 y 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys en el agua, mientras que con 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys, la K_u fue mayor en branquia y hepatopáncrea, pero fue menor que la K_d en el resto de tejidos.

Por otra parte, la suma de la concentración de selenio en los distintos tejidos con respecto a la concentración de selenio en el cuerpo completo, expresado en porcentaje, se encontró entre 86 y 113%, teniendo en cuenta para realizar el cálculo el porcentaje en peso que representa cada tejido en la almeja, como se explicó en el *Apartado 3.3.1.1* del Capítulo de Material y Métodos.

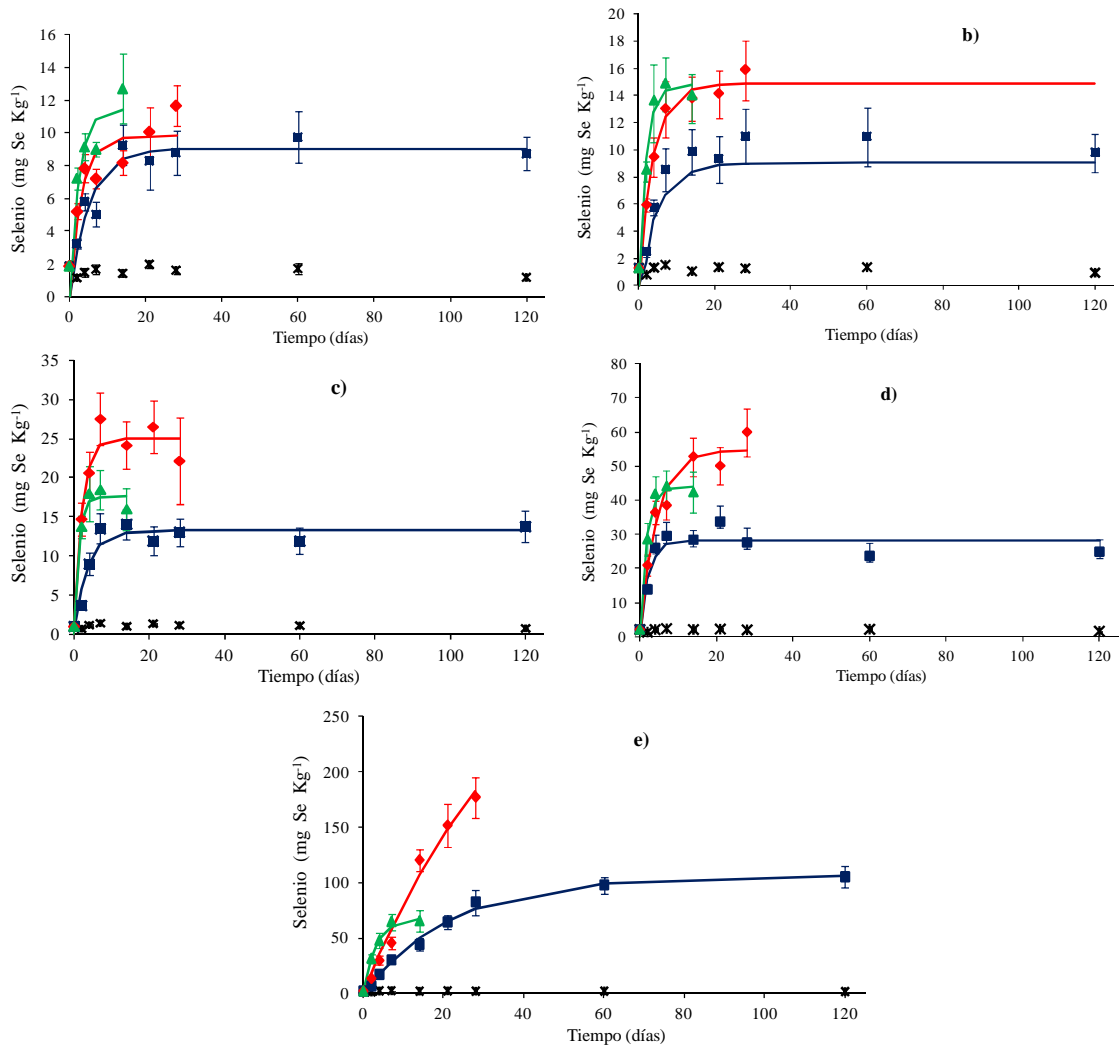


Figura 4.51. Concentración de selenio (mg Se Kg⁻¹; peso seco) en los órganos de las almejas durante el experimento de acumulación de SeMetSeCys con distintas concentraciones: a) Manto; b) Pie; c) Vísceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas. (* 0 µg Se L⁻¹, ■ 5 µg Se L⁻¹, ◆ 10 µg Se L⁻¹, ▲ 25 µg Se L⁻¹)

En general, se observó un incremento en el contenido de Se en los órganos cuando aumenta la concentración en el agua a los 14 días de exposición, ajustándose a una ecuación de segundo grado ($R=0,8443$) (Figura 4.52).

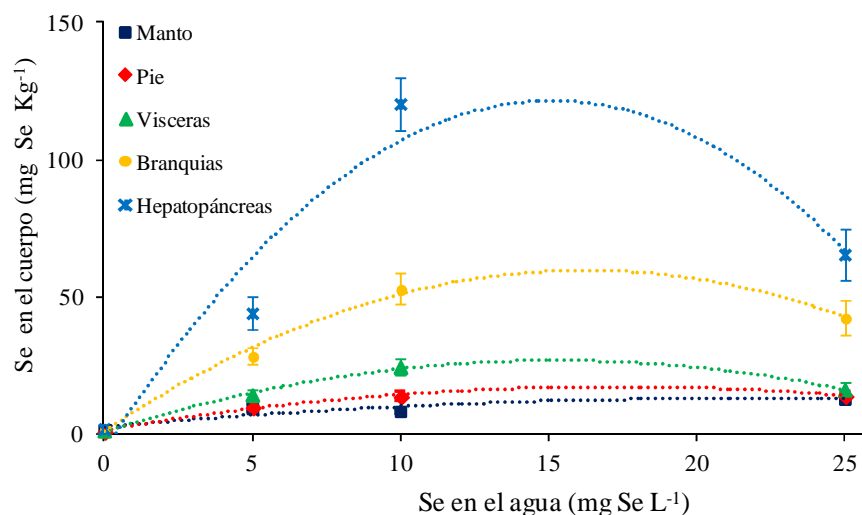


Figura 4.52. Relación entre la concentración de Se en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenito en el agua después de 14 días de exposición.

➤ *Distribución subcelular del Se en el cuerpo completo*

La separación subcelular se llevó a cabo en almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ con SeMetSeCys durante 14 y 30 días, tanto en hepatopáncreas como en branquias. Los resultados mostraron recuperaciones en el fraccionamiento subcelular del tejido con respecto a su concentración total del 98 y 108% para hepatopáncreas y del 85 y 109% para branquias (Figura 4.53 y Tabla 4.16).

Tabla 4.16: Concentración (mg Se Kg^{-1} , peso seco) de selenio total y la distribución en las fracciones biológicamente activa, detoxificada y núcleos y desechos celulares, en hepatopáncreas y branquias, de almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys durante 14 y 30 días (LD: por debajo del límite de detección)

	Hepatopáncreas			Branquias		
	Control	14 días	30 días	Control	14 días	30 días
Se total	1,96	120	97,7	2,09	52,8	60,0
Distribución de selenio						
Se activo biológicamente	<LD	32,3	34,1	<LD	4,57	16,2
Se detoxificado biológicamente	<LD	51,5	73,6	<LD	32,1	33,3
Núcleos y desechos celulares	<LD	46,4	65,3	<LD	8,39	15,9

En hepatopáncreas, entre el 20 y el 25% del contenido de selenio se encontró biológicamente activo, mientras que en las branquias fue entre el 10 y el 18%. La mayor parte del selenio, en ambos órganos, se encontró en las fracciones biológicamente detoxificadas y en los núcleos y desechos celulares (75-89%), principalmente en proteínas estables y núcleos y desechos celulares.

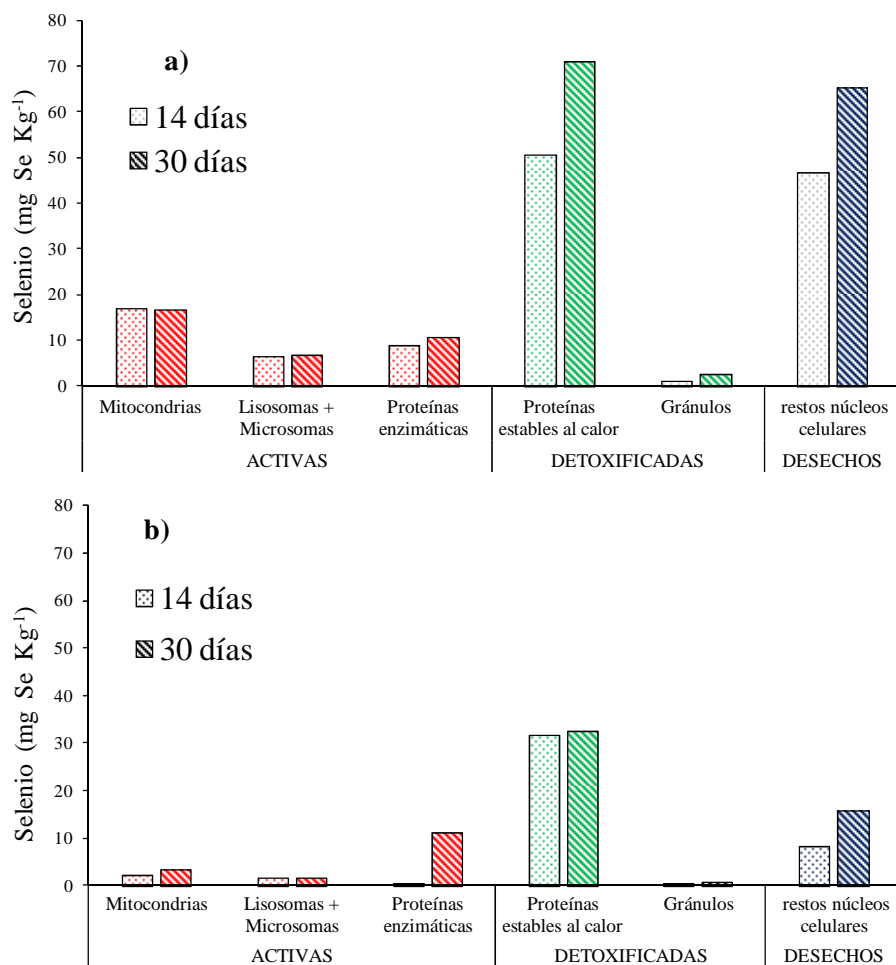


Figura 4.53. Concentración de selenio (mg Se Kg^{-1} , peso seco) en las distintas fracciones de la separación subcelular en órganos de almejas expuestas con $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys durante 14 y 30 días: a) hepatopáncreas; b) branquias

4.3.3.2. Especiación de selenio en almeja fina cultivada con SeMetSeCys

Los resultados de especiación en los extractos de hidrólisis enzimática con proteasa/lipasa, tanto en el cuerpo completo como en los tejidos de las almejas expuestas a distintas concentraciones de SeMetSeCys a través del agua durante 120 días, mostraron la presencia de distintas especies de selenio (Figura 4.54).

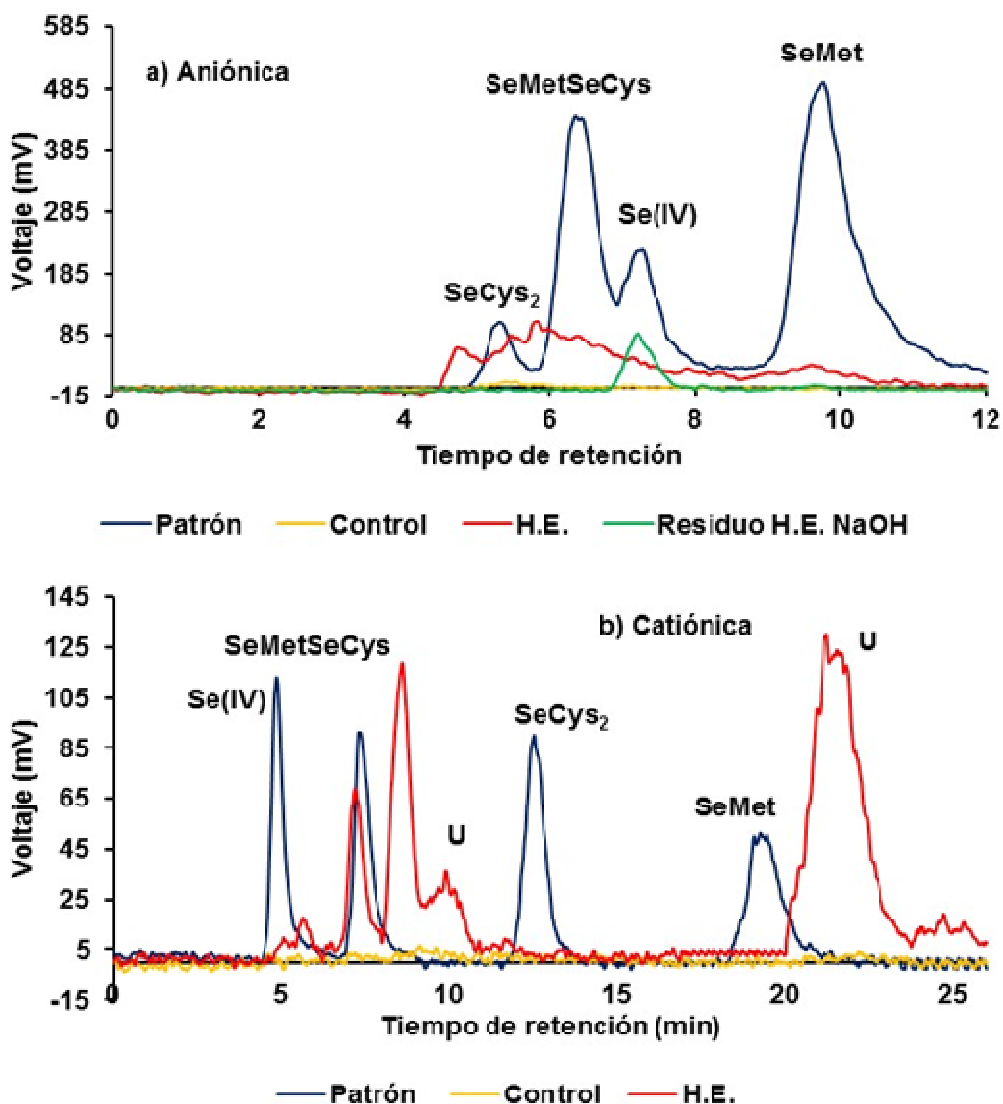


Figura 4.54. Cromatogramas de especies de selenio en almejas cultivadas con $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet durante 60 días mediante extracción secuencial de proteasa/lipasa y NaOH 0,02 M con HPLC-UV-TR-HG-AFS: a) Intercambio aniónico; b): intercambio catiónico

En la identificación de especies mediante el acoplamiento instrumental HPLC-UV-TR-HG-AFS, por intercambio aniónico no se obtuvo una buena resolución en los picos cromatográficos de los compuestos, mientras que por intercambio catiónico se identificó SeMetSeCys y tres especies no identificadas (U2, U3 y U4 que eluyeron a 5,7; 9,4; 11,5 y 23,1 min). En cuanto al residuo de la hidrólisis enzimática tratado con hidróxido sódico, mediante el acoplamiento HPLC-UV-TR-HG-AFS por intercambio aniónico se observó la presencia de Se(IV).

El porcentaje de especies de selenio identificado, con respecto a la concentración de selenio presente en el cuerpo completo y los tejidos expuestos a distintas concentraciones

de SeMet, se encontró entre 9 y 38%, lo que indica que un porcentaje alto de las especies presentes en los extractos fueron desconocidas.

➤ *Especiación de selenio en el cuerpo completo*

En la Figura 4.55 se muestra como varió la concentración de las especies de selenio en el cuerpo completo con el tiempo de exposición, incrementando la concentración de las especies conocidas en los tejidos de almeja en el siguiente orden:



Las concentraciones de las especies de selenio se ajustan a modelos cinéticos de primer orden ($R > 0,708$).

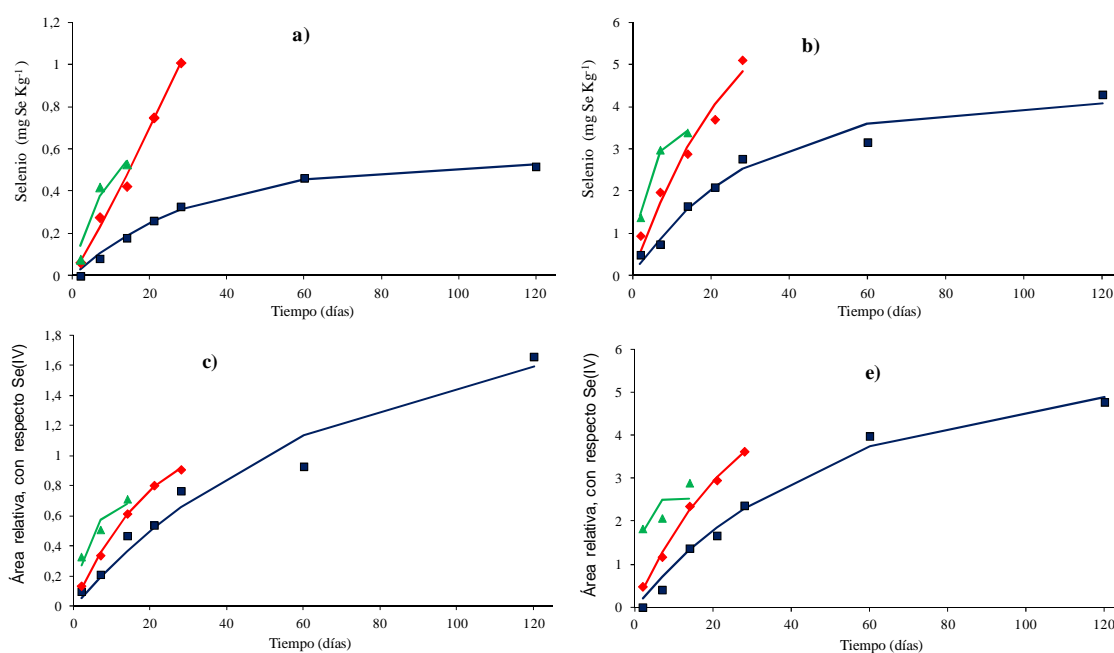


Figura 4.55. Concentración de especies de selenio (conocidas: mg Se Kg^{-1} , peso seco; desconocidas: área especie / área Se(IV)) en los tejidos de almejas mediante HPLC-TR-UV-HG-AFS durante el experimento de acumulación de SeMetSeCys con distintas concentraciones: a) Se(IV) ; b) SeMetSeCys; c) Compuesto desconocido U3; e) Compuesto desconocido U4. (■ $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$, ◆ $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$; ▲ $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$)

➤ *Especiación de selenio en los tejidos*

La especiación en los distintos órganos de las almejas se llevó a cabo en el grupo de almejas cultivadas en presencia de $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys a 14, 30 y 60 días de exposición, obteniendo las mismas especies presentes que para el tejido completo. La

SeMetSeCys (76%) y U4 (67%) fueron las especies que se encontraron en mayor concentración, dentro de las especies conocidas y desconocidas, respectivamente.

De forma similar que en el caso de selenio total, el pie y el manto son los órganos que presentan menor concentración de especies, mientras que la mayor la presentan branquias y hepatopáncreas, como se puede comprobar en la Figura 4.56.

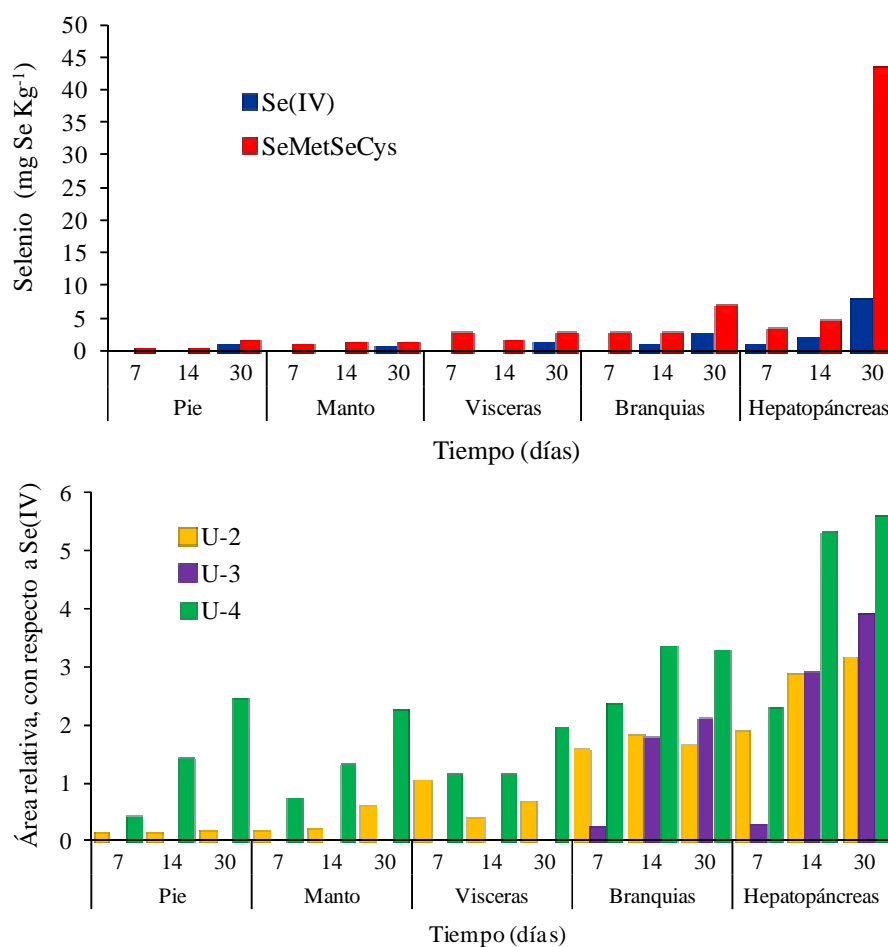


Figura 4.56. Concentración de especies de selenio (conocidas: mg Se Kg⁻¹, peso seco; desconocidas: área especie / área Se(IV)) en los distintos tejidos de las almejas expuestas a 10 µg de Se L⁻¹ de SeMetSeCys

➤ **Distribución subcelular del Se en los tejidos**

La especiación en las distintas fracciones de la separación subcelular se realizó en branquias y hepatopáncreas de almejas expuestas con 25 µg Se L⁻¹ de SeMetSeCys durante 14 días, las especies identificadas fueron Se(IV), SeMetSeCys, U2 y U4 (Figura 4.57), presentando una distribución similar en las distintas fracciones.

El Se(IV) se encontró principalmente en los desechos de núcleo celulares, la SeMetSeCys y la especie desconocida U2 en la fracción de proteínas estables al calor (fracción biológicamente inactiva) para ambos tejidos y, por último, la especie desconocida U4 se distribuyó dentro de la fracción biológicamente activa, localizándose principalmente en la fracción de lisosomas y microsomas (18-29%), así como en la fracción biológicamente detoxificada, localizándose en las proteínas estables al calor (71-82%).

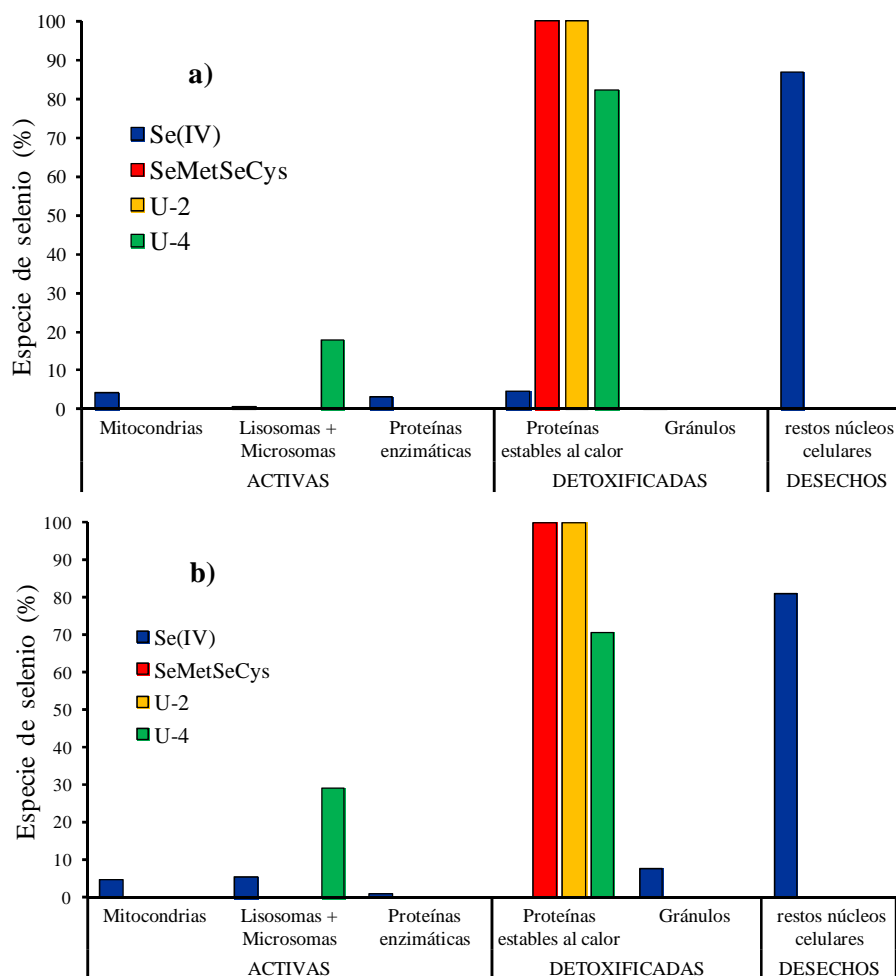


Figura 4.57. Especies de selenio (%) extraídas en las fracciones subcelulares de almejas expuestas con 25 µg de Se L⁻¹ de SeMetSeCys durante 14 días, mediante hidrólisis enzimática-NaOH y HPLC-TR-UV-HG--AFS, en: a) hepatopáncreas y b) branquias.

4.3.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENOMETILSELENOCISTEINA EN LAS ALMEJAS

El grupo de almejas expuestas a 5 µg Se L⁻¹ de SeMetSeCys durante 60 días, posteriormente se mantuvieron en sustratos de arena con agua de mar en circuito abierto durante 60 días para llevar a cabo un estudio de eliminación. Durante este ensayo, se estudió el grado de enterramiento de las almejas y la mortalidad. Los resultados se

muestran en la Figura 4.58, donde se puede observar que la TE(50) se alcanzó a las 12 horas.

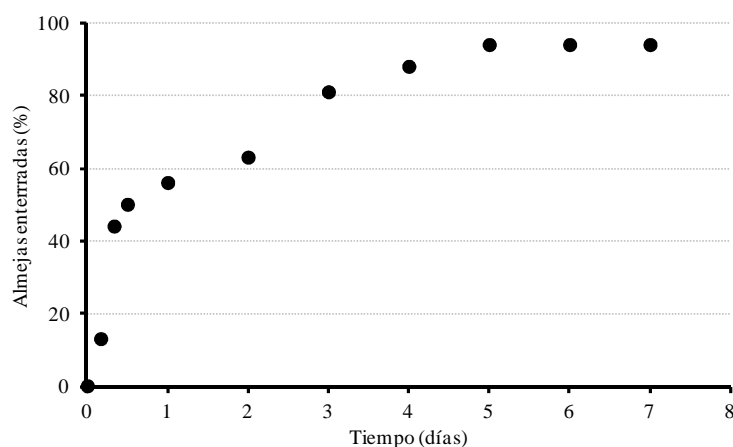


Figura 4.58. Evolución del enterramiento de las almejas (%) durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber estado expuestas durante 60 días a $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys.

Respecto a la supervivencia, se puede apreciar en la Figura 4.59 que la mortalidad a los 7 días fue menor del 20%, por lo que no se apreció en $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys ningún efecto post-exposición, ni en mortalidad, ni en enterramiento.

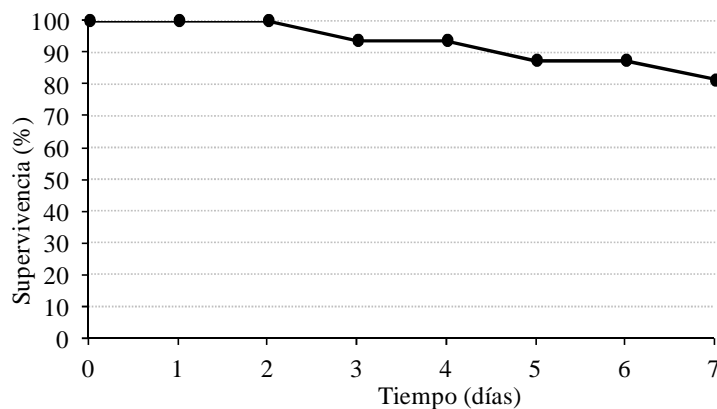


Figura 4.59. Evolución de la supervivencia de las almejas (%) durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber estado expuestas durante 60 días a $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys

➤ *Eliminación del Se en el cuerpo completo*

Los resultados de la eliminación de SeMetSeCys en el cuerpo completo de la almeja siguieron una curva exponencial con respecto al tiempo, con una concentración final de selenio en el tejido de $7,33 \pm 0,81 \text{ mg Se Kg}^{-1}$ (en peso seco) (Figura 4.60), ajustándose a cinéticas de primer orden.

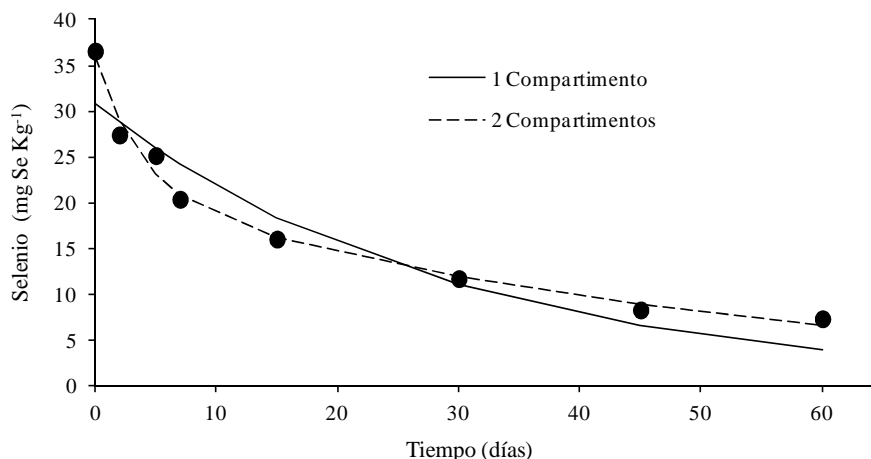


Figura 4.60. Comparación del contenido de Se (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) observado (\bullet) y predicho en las almejas durante el experimento de depuración, mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento y 2 compartimentos.

Los resultados mostraron que la concentración de selenio predicha no difiere significativamente con las concentraciones observadas usando modelos cinéticos de uno y dos compartimentos, con coeficientes de correlación 0,983 y 0,992 respectivamente, y no llegando al estado estacionario. El tiempo de vida media biológico, usando estos modelos cinéticos, fue de 19 y 33 días, respectivamente, indicando que el selenio es muy persistente en la almeja (Tabla 4.17)

Tabla 4.17. Coeficientes cinéticos en el ensayo de depuración de SeMetSeCys en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

$[\text{Se}]_i$	1 Compartimento		2 Compartimentos	
32,6	A	30,91	A₁	14,4
	K_d	0,034	K_{d1}	0,275
	t_{1/2}	19	(t_{1/2})₁	2
	R	0,991	A₂	21,4
			K_{d2}	0,020
			(t_{1/2})₂	32
			R	0,994

➤ *Eliminación del Se en los tejidos*

El mismo comportamiento se observó en los tejidos de las almejas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.18 y Figura 4.61 y se puede comprobar que el modelo cinético de dos compartimentos se ajusta mejor a los datos observados, con coeficientes de regresión mayores de $R = 0,991$ para todos los órganos.

Por otra parte, la vida media biológica ($t_{1/2}$) es mayor en el modelo cinético de un compartimento para todos los tejidos. Cuando se usa el modelo cinético de un compartimento, el valor de la vida media se encuentra en el rango comprendido entre 4 y 39 días en los tejidos, indicando una baja persistencia en algunos tejidos del selenio, como en el hepatopáncreas que persiste 4 días, y en otros órganos persiste mucho tiempo como en el manto. Cuando se usa el modelo cinético de dos compartimentos, al principio se observa una eliminación rápida del selenio, entre el primer y tercer día para todos los tejidos y, posteriormente, la eliminación es lenta llegando hasta 98 días para el manto.

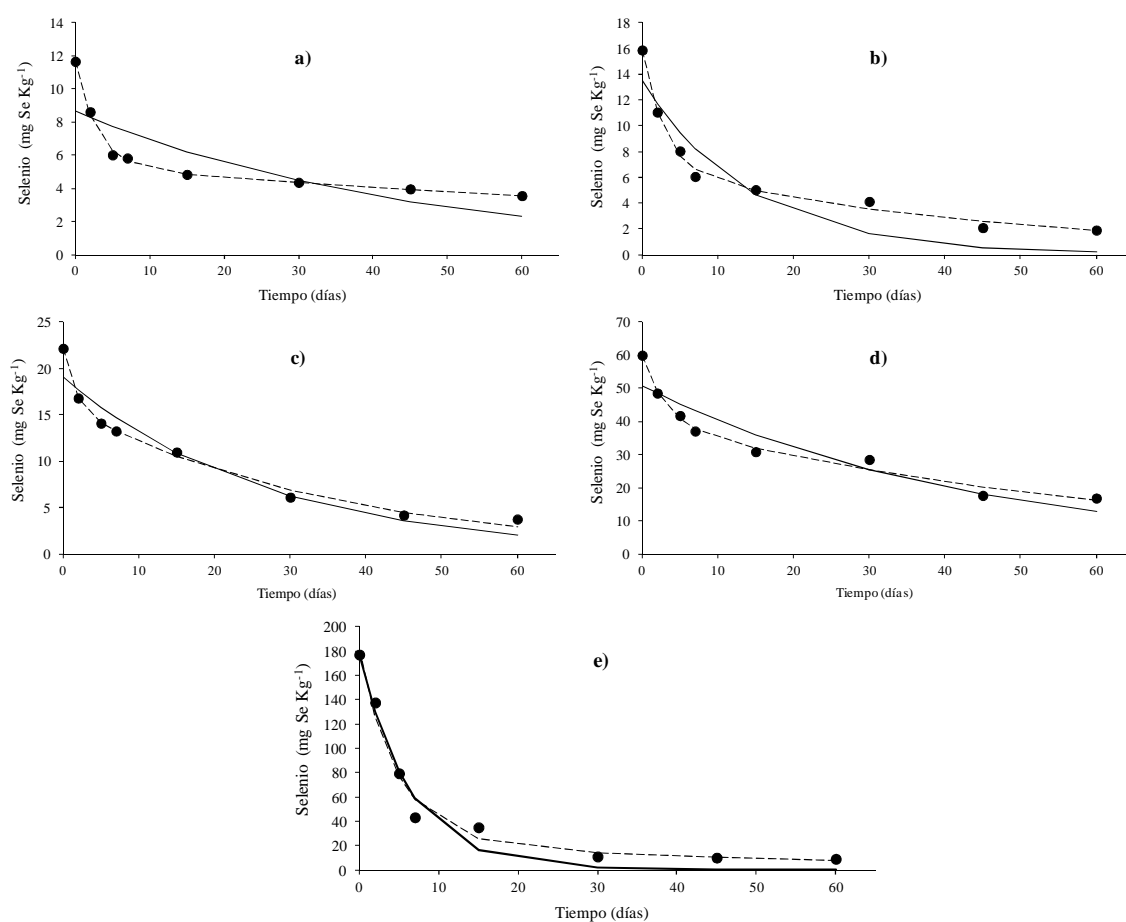


Figura 4.61. Comparación del contenido de Se (mg Se Kg⁻¹; peso seco) observado (●) y predicho en las almejas procedentes del cultivo con SeMetSeCys, durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua). a) Manto; b) Pie; c) Vísceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas

Tabla 4.18. Coeficientes cinéticos para el manto, pie, vísceras, branquias y hepatopáncreas durante el experimento de depuración de la SeMetSeCys en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R : coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

	Manto	Pie	Vísceras	Branquias	Hepatopáncreas
<i>1 compartimento</i>					
$[\text{Se}]_i$	11,7	15,9	22,2	60,0	177
A	8,66	13,5	19,1	50,7	179
K_d	0,033	0,071	0,037	0,023	0,158
t_{1/2}	39	9	17	28	4
R	0,804	0,919	0,967	0,938	0,984
<i>2 compartimentos</i>					
$[\text{Se}]_i$	11,7	15,9	22,2	60,0	177
A₁	6,40	9,11	6,06	20,0	157
K_{d1}	0,339	0,350	0,677	0,337	0,210
(t_{1/2})₁	2	2	1	2	3
A₂	5,3	6,79	16,1	39,9	24,5
K_{d2}	0,007	0,021	0,028	0,015	0,018
(t_{1/2})₂	98	30	23	43	35
R	0,999	0,997	0,997	0,994	0,991

➤ **Especiación del Se en el cuerpo completo en la eliminación**

Por último, se determinaron las especies de selenio presente en el cuerpo completo, e igual que en acumulación, las especies que se encontraron en la muestras son Se(IV), SeMetSeCys y tres especies desconocidas U2, U3 y U4.

Los resultados para todas las especies, tanto identificadas como desconocidas, se ajustan a un modelo cinético de primer orden (Figura 4.62 y Tabla 4.19). El tiempo de vida media, indica que la eliminación de las especies es rápida y siguen este orden:

$$U2 < U4 < U3 = \text{Se(IV)} < \text{SeMetSeCys}$$

Tabla 4.19. Coeficientes cinéticos para las especies presentes durante el experimento de depuración del SeMetSeCys en *R. decussatus*. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R : coeficiente de correlación; $[Se]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

	Se(IV)	SeMetSeCys	U2*	U3*	U4*
<i>1 compartimento</i>					
[Se] _i	0,518	4,29	1,66	0,478	4,77
A	0,526	4,12	1,57	0,484	4,29
K _d	0,224	0,342	0,134	0,235	0,164
t _{1/2}	3	2	5	3	4
R	0,989	0,974	0,978	0,951	0,918
<i>2 compartimentos</i>					
[Se] _i	0,518	4,29	1,66	0,478	4,77
A ₁	0,262	2,50	1,26	0,336	2,18
K _{d1}	0,224	1,35	0,092	0,235	1,87
(t _{1/2}) ₁	3	1	7	3	14
A ₂	0,264	1,79	0,393	0,148	2,34
K _{d2}	0,224	0,116	7,74	0,235	9,79
(t _{1/2}) ₂	3	6	0	3	1
R	0,989	0,999	0,996	0,951	0,999

* Área relativa con respecto a Se(IV)

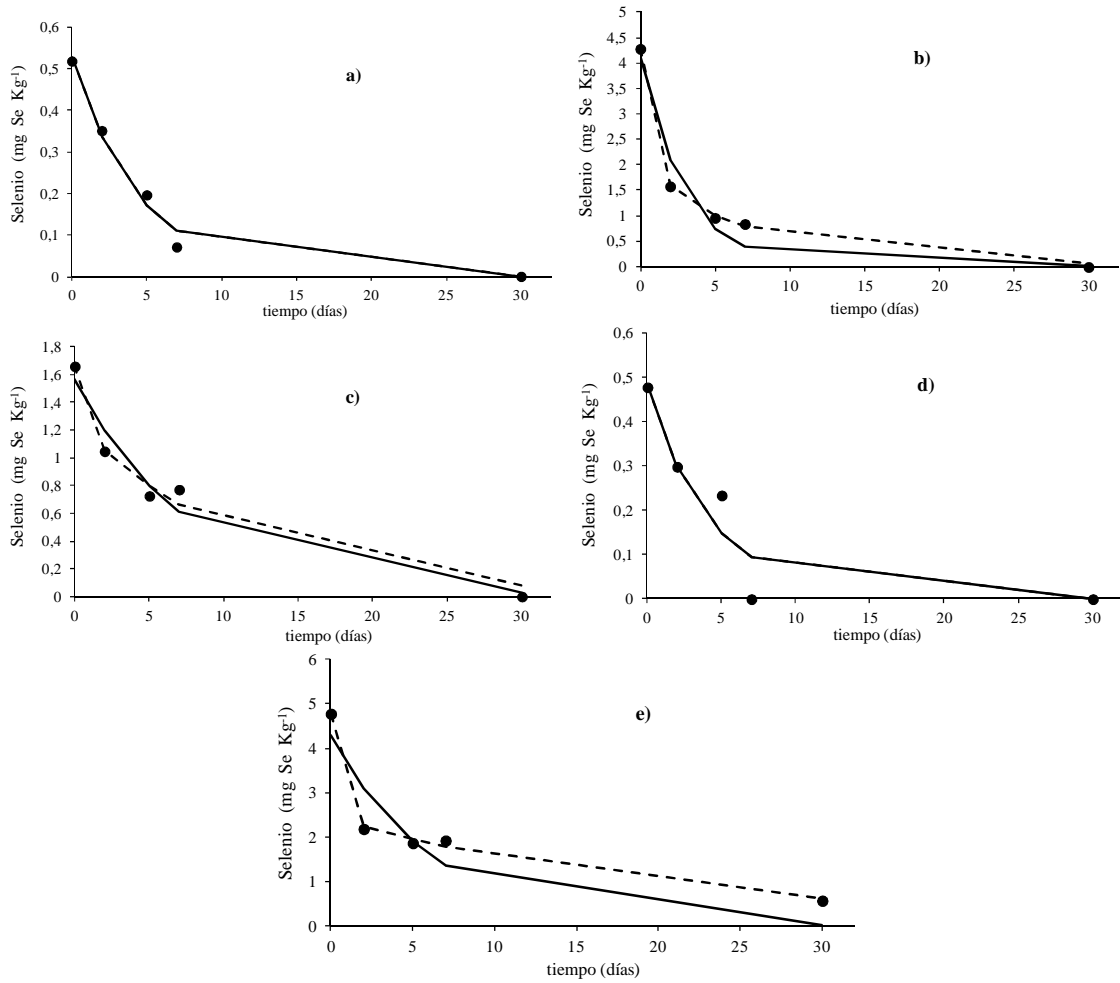


Figura 4.62 Comparación del contenido de especies de Se (mg Se Kg⁻¹; peso seco) observado (●) y predicho en las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos de depuración de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua). a) Se(IV); b) SeMetSeCys; c) SeMet; d) U1 d) U2; e) U3; f) U4

4.4. *Isochrysis galbana* clon T-Iso A TRAVÉS DE LA DIETA

4.4.1. MORTALIDAD

Los resultados de mortalidad de las almejas alimentadas con distintos porcentajes de Tiso enriquecida con selenio en la dieta mostraron una mortalidad de un 35 % para la mayoría de las dosis y el control (Figura 4.63)

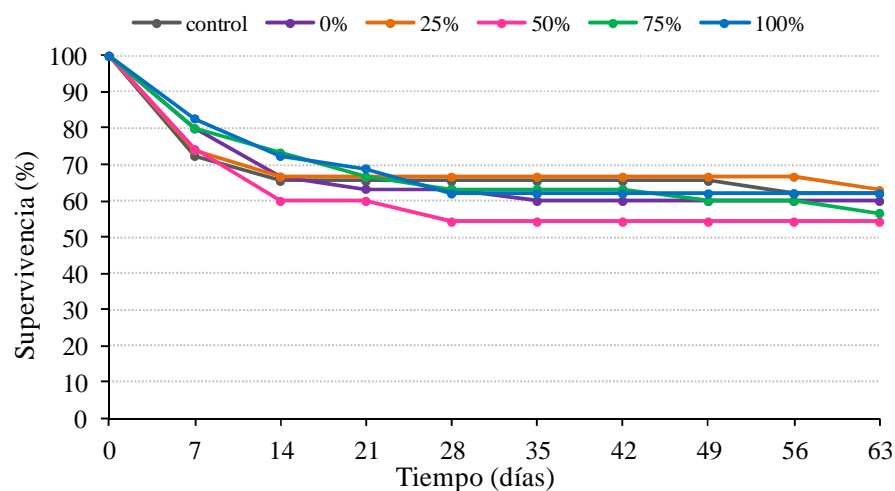


Figura 4.63 Evolución de la supervivencia acumulada en las almejas con distintas dietas de Tiso enriquecida con selenio

4.4.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

4.4.2.1. Tasa de aclaramiento (TA)

En la tasa de aclaramiento no se observaron diferencias significativas entre todos los grupos de almejas y para todas las dietas estudiadas (ANOVA, $p=0,950$) durante todo el periodo de exposición (Figura 4.64)

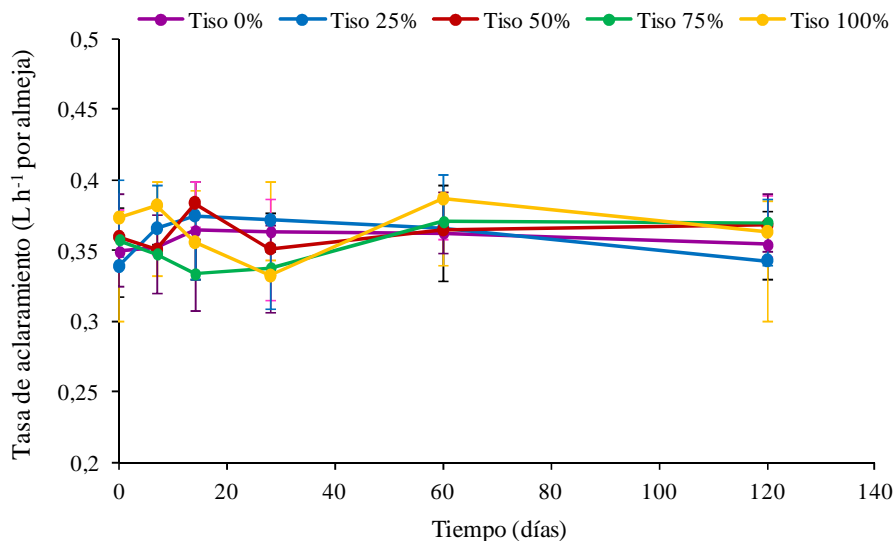


Figura 4.64 Evolución de la tasa de aclaramiento en *R. decussatus* con distintas dietas de Tiso enriquecida con selenio durante 120 días.

4.4.2.2. Actividad enzimática

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas a los 60 días de exposición en la actividad GPx, y LPO entre el control y las distintas dietas del ensayo con Tiso, en ninguno de los dos tejidos (ANOVA, $p > 0.297$).

La actividad GPx-Se presentó diferencia significativa a los 60 días de exposición respecto a la dieta (ANOVA, $p = 0.000$), siendo la actividad enzimática mayor en el control tanto en branquia como en hepatopáncreas (Figura 4.65).

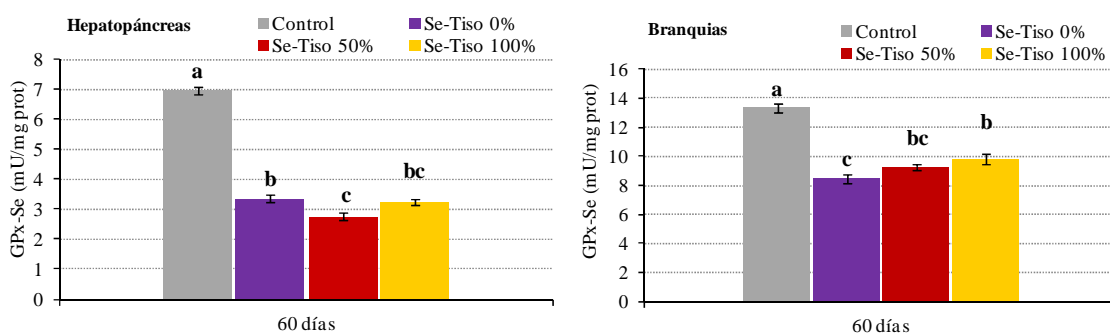


Figura 4.65. Actividad GPx-Se (media \pm error estándar; $n = 10$), en hepatopáncreas y branquia, a los 60 días de exposición para el control y los grupos expuestos a distintas dosis de Tiso enriquecida con selenio en la dieta. (Las letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas).

La actividad GST en el hepatopáncreas presentó diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.000$) al final del periodo de exposición entre el control y los grupos alimentados con dietas de 0, 50 y 100% de Tiso.

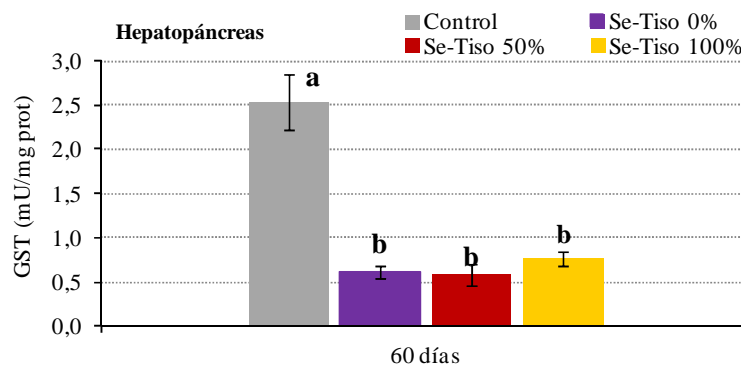


Figura 4.66. Actividad GST (media \pm error estándar; n = 10) en el hepatopáncreas al final de la exposición, para el control y los grupos alimentados con Tiso enriquecida con selenio. *Las letras diferentes presentan diferencias significativas

4.4.3. ACUMULACIÓN DE SELENIO A TRAVÉS DE LA DIETA

4.4.3.1. Selenio total

➤ Acumulación de Se en el cuerpo completo

Las concentraciones de selenio total, SeMet y Se(IV) en la microalga *Isochrysis galbana* clon Tiso fueron 109; 10,6 y 27,1 mg Se Kg⁻¹ de microalgas en base seca, respectivamente. Las concentraciones de selenio total y especies presentes en las distintas dietas ensayadas para las almejas se muestran en la Tabla 4.20.

Tabla 4.20. Concentración de selenio total y especies (mg Se almeja⁻¹; mg Se Kg⁻¹ (de almejas); en peso seco) presentes en las dietas ensayadas para las almejas con *Isochrysis galbana* clon T-Iso enriquecida con selenio

Tiso enriquecida (% en dieta)	Total		Se(IV)		SeMet	
	($\mu\text{g Se almeja}^{-1}$)	(mg Se Kg ⁻¹)	($\mu\text{g Se almeja}^{-1}$)	(mg Se Kg ⁻¹)	($\mu\text{g Se almeja}^{-1}$)	(mg Se Kg ⁻¹)
0	0,021	0,042				
25	0,546	1,092	0,053	0,872	0,135	1,744
50	1,092	2,184	0,106	2,184	0,270	4,368
75	1,639	3,278	0,160	4,368	0,405	8,736
100	2,185	4,37	0,213	6,556	0,540	13,112

Los resultados de selenio total en el cuerpo completo de las almejas alimentadas con microalgas Tiso enriquecida con selenio en un rango de concentraciones comprendida entre 0 y 4,369 $\mu\text{g Se Kg}^{-1}$ en la dieta durante 120 días se muestra en la Figura 4.67

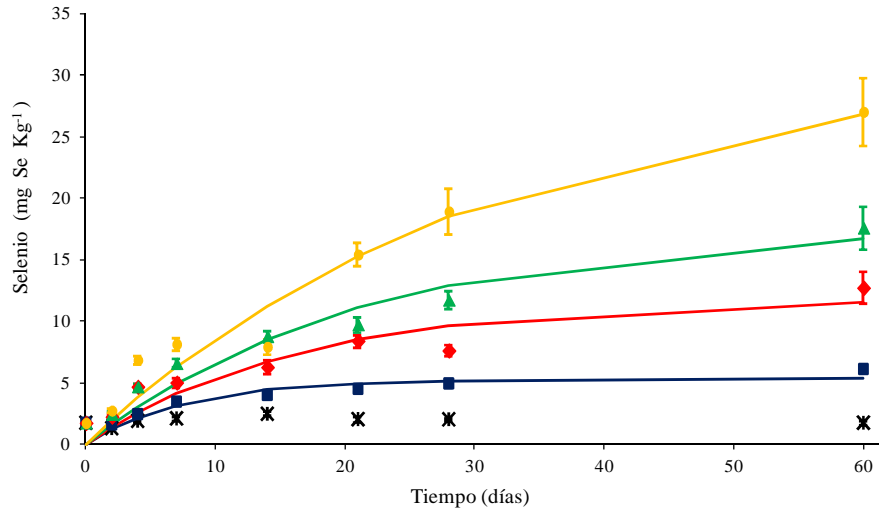


Figura 4.67 Concentración total de selenio (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en el cuerpo completo de las almejas alimentada con Tiso enriquecida con selenio con respecto al tiempo (* $0 \mu\text{g Se L}^{-1}$, ■ $1,09 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso, ◆ $2,18 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso; ▲ $3,28 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso; ● $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso).

En las dietas estudiadas se observó un incremento significativo en la concentración de selenio en el cuerpo completo de las almejas (ANOVA, $p=0.00001$), ajustándose el incremento de la concentración de selenio en la dieta a modelos cinéticos de primer orden ($R>0,871$). Asimismo, las distintas dietas con Tiso enriquecida con selenio presentaron diferencia significativa al final del experimento (ANOVA, $p=0.00001$).

Los parámetros que describe el modelo cinético considerando la entrada de selenio a través del alimento se muestra en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21. Coeficientes cinéticos para *Ruditapes decussatus* durante el periodo de exposición (120 días) alimentada con distintas concentraciones de Se-Tiso.

Concentración alimento ($\mu\text{g Se g}^{-1}$)	Ke (día^{-1})	Ku ($\text{L} \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	AE (%)	IR ($\text{g} \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	TTF
1,092	0,129	0,627	69	0,702	3,75
2,185	0,061	0,327	78	0,700	8,95
3,277	0,046	0,251	68	0,712	10,52
4,370	0,031	0,227	69	0,742	16,53

Los resultados muestran que la eficiencia de absorción se encuentra entre el 68% y el 78% en las almejas alimentadas concentraciones de selenio. La relación de la ingesta incrementa con la concentración de selenio en alimento, mientras que la constante de eliminación disminuye. En cuanto a la tasa de crecimiento, no se observó cambio de crecimiento de las almejas durante el experimento. Por último, el factor de transferencia trófica incrementa con la concentración de selenio en el alimento.

Por otra parte, la concentración total de selenio en almejas alimentadas con microalgas enriquecidas con Se incrementó de forma lineal cuando aumentaba la concentración de total de selenio en la dieta a los 60 días del tratamiento, con un coeficiente de regresión de 0,982 (Figura 4.68).

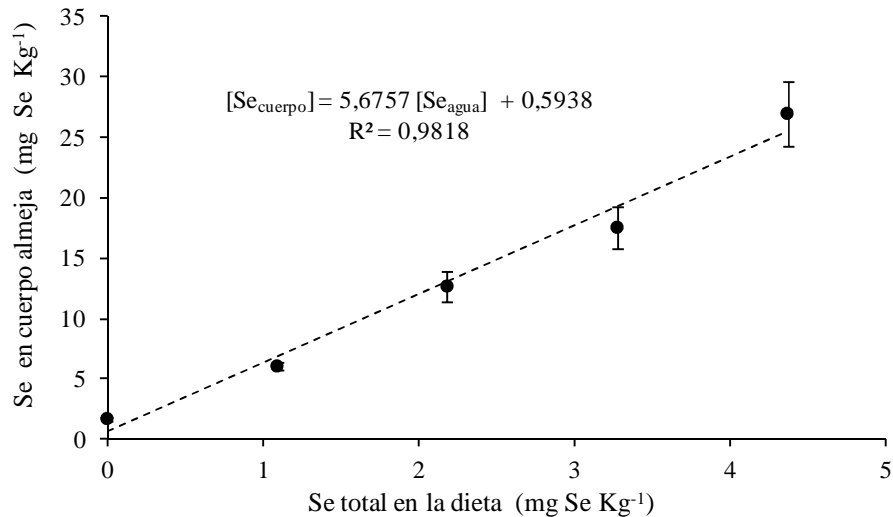


Figura 4.68 Concentración total de selenio en el cuerpo completo de almejas con respecto a la concentración de selenio en la dieta microalgal durante 60 días

➤ *Distribución tisular del Se en el cuerpo completo*

En la figura se muestra la concentración total de selenio en los tejidos de la almeja con respecto al tiempo, observándose que se ajustó a un modelo cinético de primer orden ($R > 0,802$).

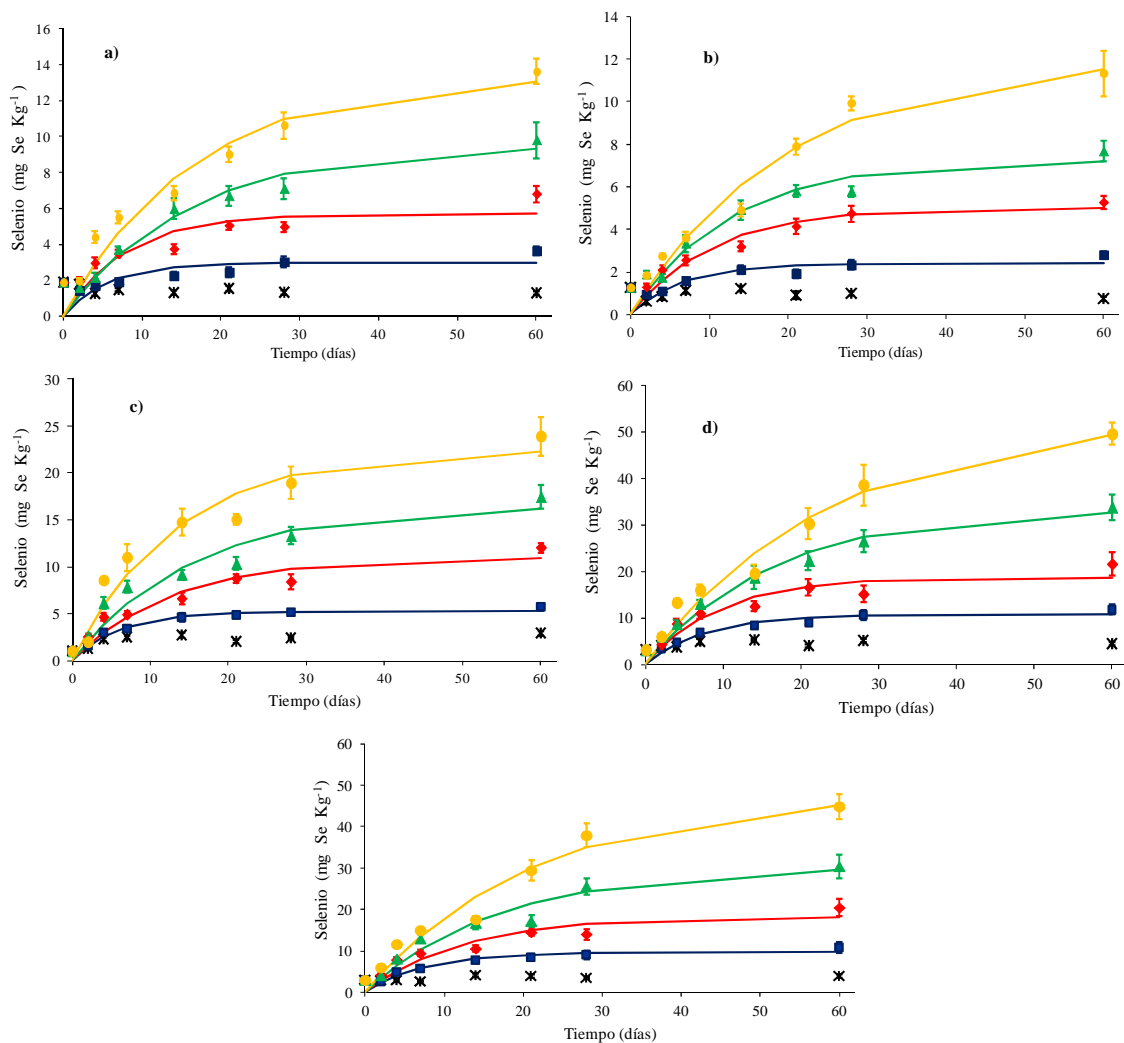


Figura 4.69 Concentración de selenio total (mg Se Kg^{-1} ; peso seco) en los tejidos de las almejas incorporándolo en distintas concentraciones a través de la dieta durante 60 días: a) Manto; b) Pie; c) Vísceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas. (* $0 \mu\text{g Se L}^{-1}$, ■ $1,09 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso, ◆ $2,18 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso; ▲ $3,28 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso; ● $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ Tiso)

Por otra parte, la concentración de selenio en los distintos órganos incrementó en el siguiente orden:

$$\text{Pie} = \text{Manto} < \text{Vísceras} < \text{Hepatopáncreas} = \text{Branquias}$$

Además se observó una buena correlación entre la concentración de selenio total en los tejidos y el selenio en la dieta ($R > 0,979$) (Figura 4.70)

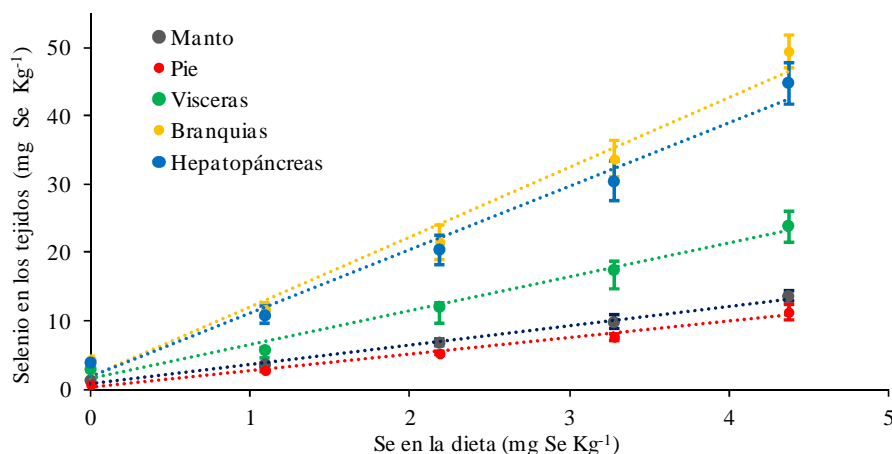


Figura 4.70 Relación entre la concentración de Se en el cuerpo completo de *Ruditapes decussatus* y la concentración de selenio en la dieta después de 60 días de exposición

➤ **Distribución subcelular del Se en el cuerpo completo**

La separación subcelular se realizó en almejas alimentadas con 4,370 $\mu\text{g Se Kg}^{-1}$ de Tiso, durante 21 y 30 días, tanto en hepatopáncreas como en branquias. Los resultados mostraron recuperaciones entre 109 y 111% para el hepatopáncreas y entre 93% y 108% para las branquias en el fraccionamiento subcelular del cuerpo completo con respecto a su concentración total (Figura 4.71y Tabla 4.22).

Tabla 4.22: Concentración (mg Se Kg^{-1} , peso seco) de selenio total y la distribución en las fracciones biológicamente activa, detoxificada y núcleos y desechos celulares, en hepatopáncreas y branquias, de almejas alimentadas con 4,370 $\mu\text{g de Se Kg}^{-1}$, durante 21 y 30 días

	Hepatopáncreas		Branquias	
	21 días	30 días	21 días	30 días
Se total	29,4	37,8	30,2	38,5
Distribución de selenio				
Se activo biológicamente	1,78	1,56	1,47	1,76
Se detoxificada biológicamente	18,9	21,0	25,3	28,1
Núcleos y desechos celulares	11,3	19,4	5,90	6,14

Para ambos tejidos, el contenido de selenio biológicamente activo fue menor del 6%, encontrándose en la fracción biológicamente detoxificadas, núcleos y desechos celulares, repartido principalmente entre las proteínas estables (76 -48 %) y en los núcleos y desechos celulares (17-46%).

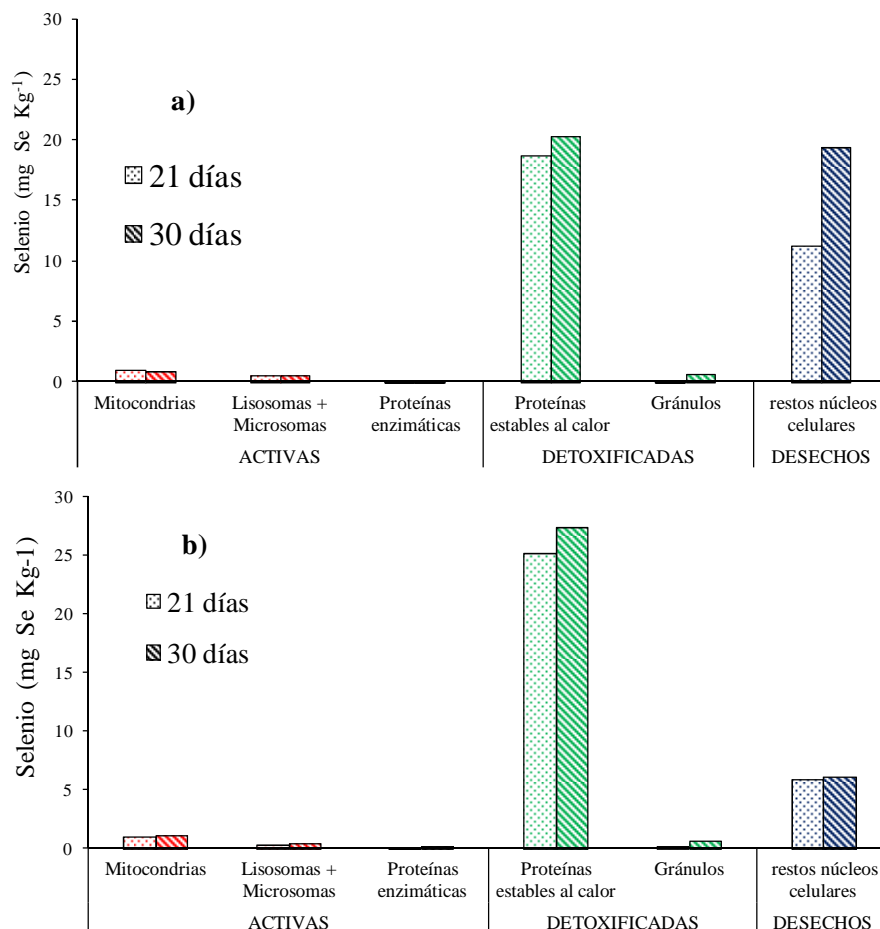


Figura 4.71 Concentración de selenio (mg Se Kg⁻¹, peso seco) en las distintas fracciones de la separación subcelular en órganos de almejas alimentadas con 4,370 µg de Se Kg⁻¹, durante 21 y 30 días, a) hepatopáncreas; b) branquias

4.4.3.2. Especiación de selenio en almejas alimentadas con Tiso enriquecida

Los resultados de especiación en los extractos de hidrólisis enzimática con proteasa/lipasa, tanto en el cuerpo completo como en los tejidos de las almejas alimentadas con distintas dietas de microalgas Tiso enriquecidas con selenio durante 60 días, mostró la presencia de distintas especies de selenio (Figura 4.72). Las especies identificadas mediante el acoplamiento instrumental HPLC-UV-TR-HG-AFS por intercambio aniónico no tuvieron una buena resolución en los picos cromatográficos de los compuestos, mientras que por intercambio catiónico se identificó SeMetSeCys y cuatro especies no identificadas U1, U2, U3 y U4, que eluyeron a 5,7; 9,4; 11,5 y 23,1 min. En cuanto al residuo de la hidrólisis enzimática tratado con hidróxido sódico mediante el acoplamiento HPLC-UV-TR-HG-AFS por intercambio aniónico solo se observó la presencia de Se(IV), 577 µg Se Kg⁻¹, en almejas alimentadas con 4,370 µg Se Kg⁻¹ a los 60 días.

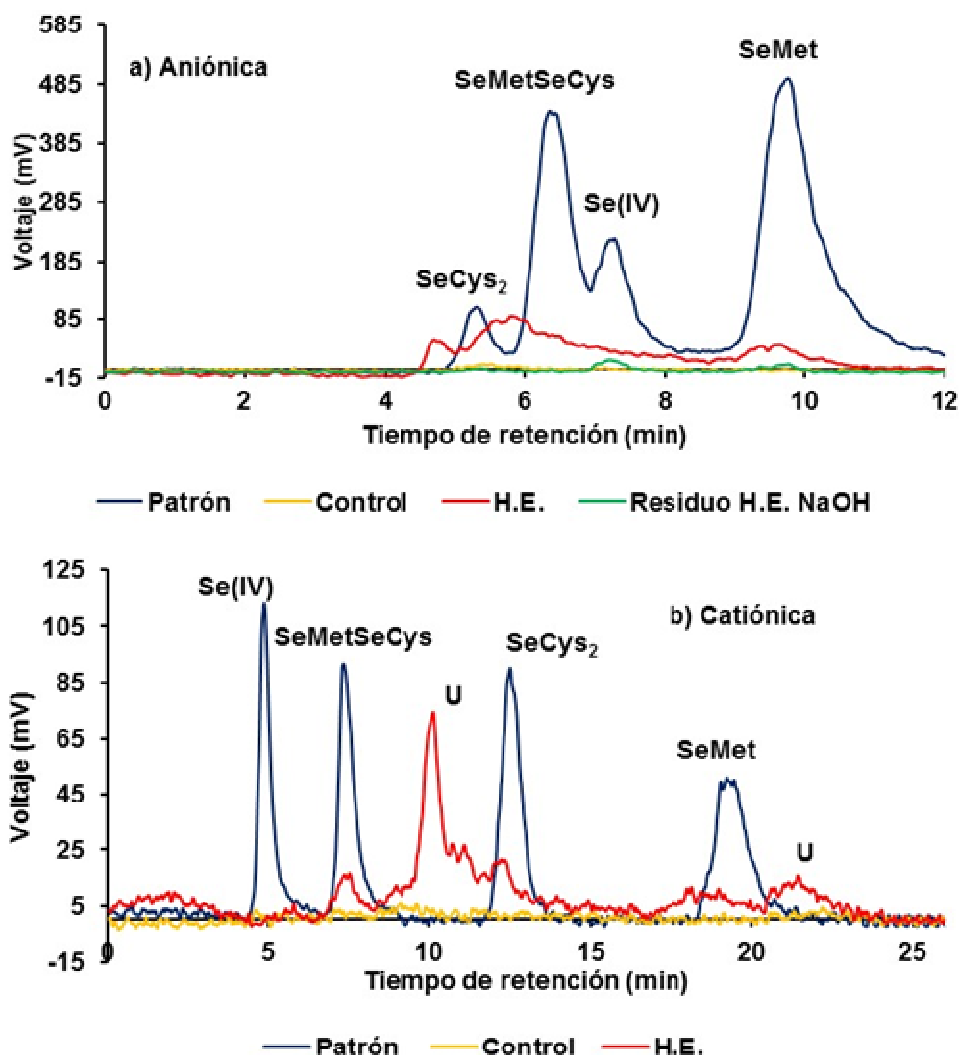


Figura 4.72 Cromatogramas de especies de selenio en almejas alimentadas con microalgas Tiso enriquecidas con $4,370 \mu\text{g}$ de Se Kg^{-1} durante 60 días mediante extracción secuencial de proteasa/lipasa y NaOH $0,02 \text{ M}$ con HPLC-UV-TR-HG-AFS: a) Intercambio aniónico; b): intercambio catiónico

El porcentaje de especies de selenio identificadas, con respecto a la concentración de selenio presente en el cuerpo completo y en los tejidos expuestos a distintas dietas de Tiso enriquecidas con selenio, se encontró entre 6 y 29%, indicando que un porcentaje alto de las especies presentes en los extractos fueron desconocidas.

➤ *Especiación de selenio en el cuerpo completo*

En la Figura 4.73 se muestra como varía la concentración de las especies de selenio en el cuerpo completo con el tiempo de exposición. Las concentraciones de las especies de selenio se ajustan a modelos cinéticos de primer orden con $R > 0,708$.

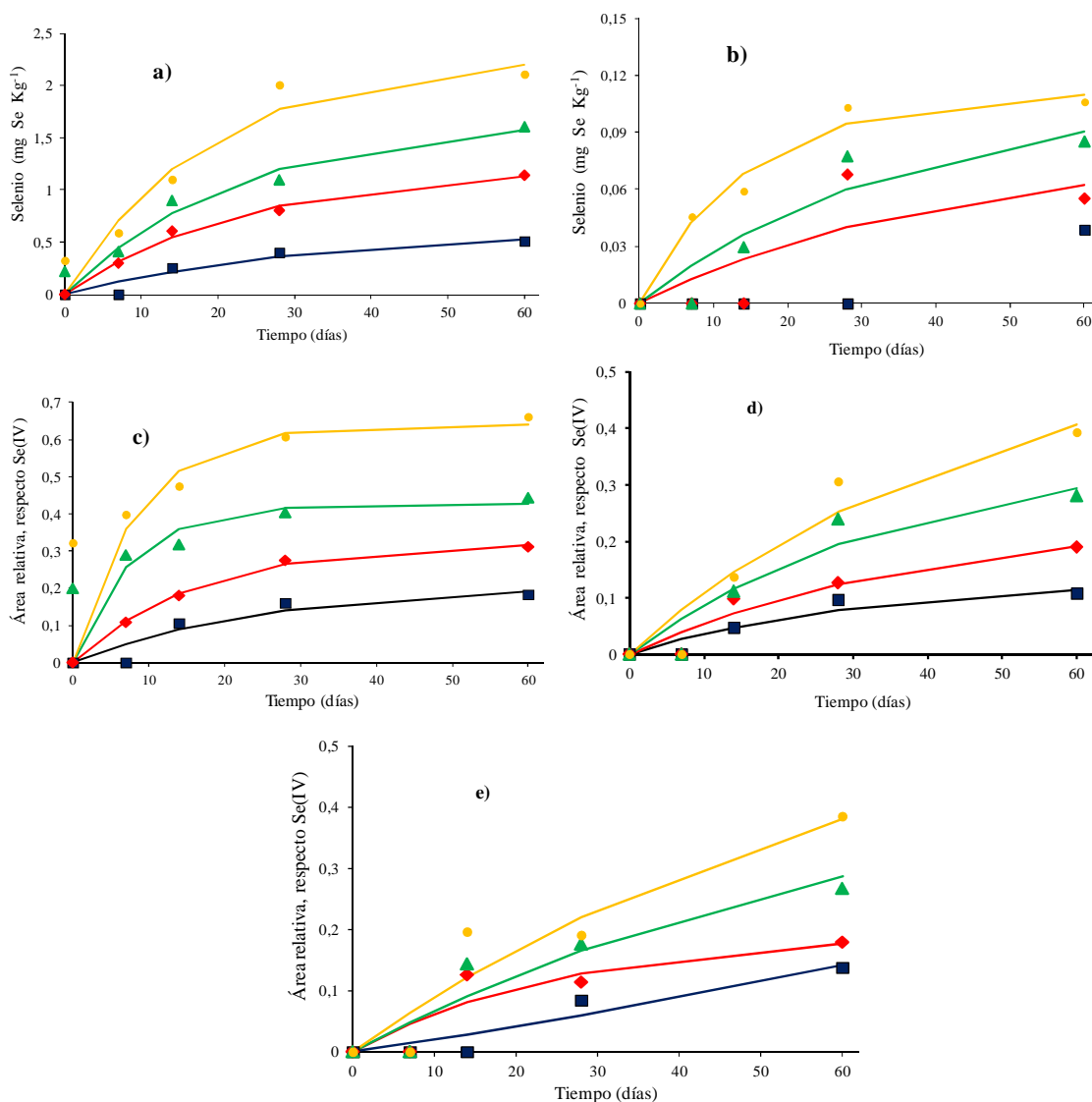


Figura 4.73 Concentración de especies de selenio (conocidas: mg Se Kg⁻¹, peso seco; desconocidas: área especie / área Se(IV)) en el cuerpo completo de la almeja mediante HPLC-TR-UV-HG-AFS durante el experimento de acumulación de SeMetSeCys con distintas concentraciones; a) SeMetSeCys; b) Compuesto desconocido U1; c) Compuesto desconocido U2; d) Compuesto desconocido U3; e) Compuesto desconocido U4. (* 0 µg Se L⁻¹, ■ 1,09 µg Se Kg⁻¹ Tiso, ◆ 2,18 µg Se Kg⁻¹ Tiso; ▲ 3,28 µg Se Kg⁻¹ Tiso; ● 4,37 µg Se Kg⁻¹ Tiso)

➤ *Especiación de selenio en los tejidos*

La especiación en los distintos tejidos de las almejas se realizó en el grupo de almejas cultivadas en presencia de 4,37 µg Se L⁻¹ de Se-Tiso a 14, 30 y 60 días de exposición. Las especies presentes son las mismas que para el cuerpo completo. La SeMet (76%) y U4 (67%) son las especies que se encuentran en mayor concentración dentro de las especies conocidas y desconocidas, respectivamente. De forma similar que en el caso de selenio total, el pie y el manto son los tejidos que presentan menor concentración de especies,

mientras que branquias y hepatopáncreas presentan la mayor concentración, como se puede comprobar en la Figura 4.74

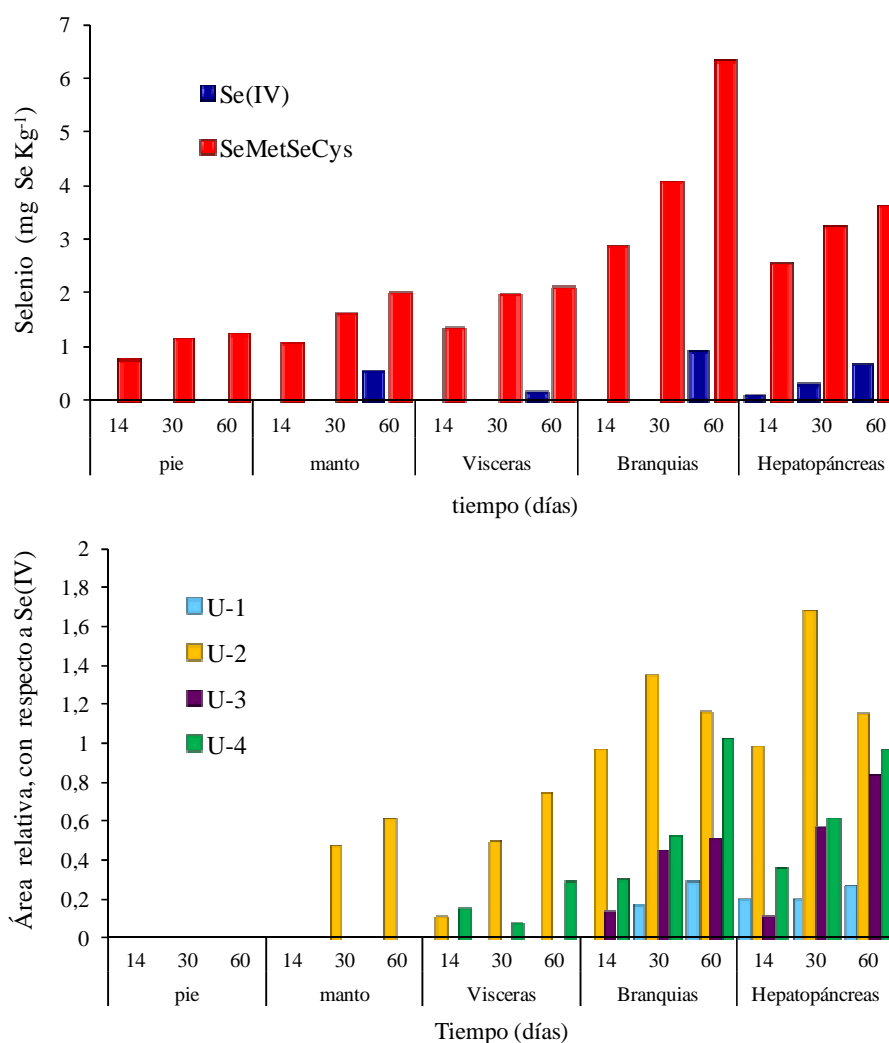


Figura 4.74 Concentración de especies de selenio (conocidas: mg Se Kg⁻¹, peso seco; desconocidas: área especie / área Se(IV)) en los distintos tejidos de las almejas alimentadas con microalgas Tiso enriquecidas con 4,370 µg de Se Kg⁻¹ a los 14, 30 y 60 días de exposición.

➤ **Distribución subcelular del Se en los tejidos**

La especiación en las distintas fracciones de la separación subcelular se llevó a cabo en branquias y hepatopáncreas de almejas alimentadas con microalgas Tiso enriquecidas con 4,370 µg Se Kg⁻¹ durante 60 días, las especies identificadas fueron Se(IV), SeMetSeCys, U2 y U4 (Figura 4.75), presentando una distribución similar en las distintas fracciones, encontrándose entre la fracción biológicamente inactiva y los núcleos y residuos celulares.

El Se(IV) se encontró principalmente en los desechos de núcleo celulares, la SeMetSeCys y la especie desconocida U4 en la fracción de proteínas estables al calor (fracción biológicamente inactiva), para ambos tejidos, y por último, la especie desconocida U2 se distribuyó en la misma proporción entre la fracción de proteínas estables al calor y los núcleos y los residuos celulares.

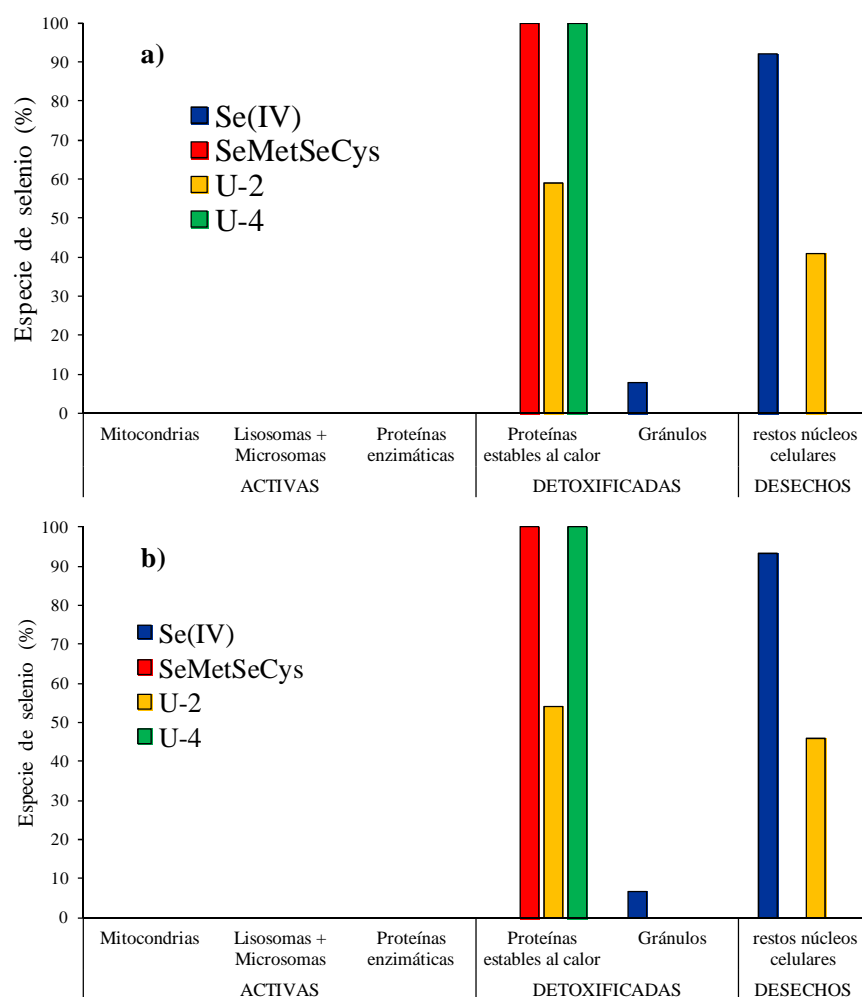


Figura 4.75 Porcentaje de especies de selenio (%) extraídas en las fracciones subcelulares de almejas alimentadas con microalgas Tiso enriquecidas con $4,370 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ durante 60 días mediante hidrólisis enzimática-NaOH y HPLC-TR-UV-HG--AFS en: a) hepatopáncreas y b) branquias.

4.4.4. ELIMINACIÓN/DEPURACIÓN DE SELENIO EN LAS ALMEJAS ALIMENTADA CON MICROALGAS ENRIQUECIDA CON SELENIO

El grupo de almejas alimentadas con $4,370 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ durante 60 días, se mantuvieron en sustratos de arena con agua de mar en circuito abierto durante 60 días para llevar a cabo un estudio de eliminación. Durante este experimento, se estudió el grado de enterramiento de

las almejas y la mortalidad. Los resultados se muestran en la Figura 4.76 donde se puede observar que el 50% de las almejas se enterraron a las 12 horas.

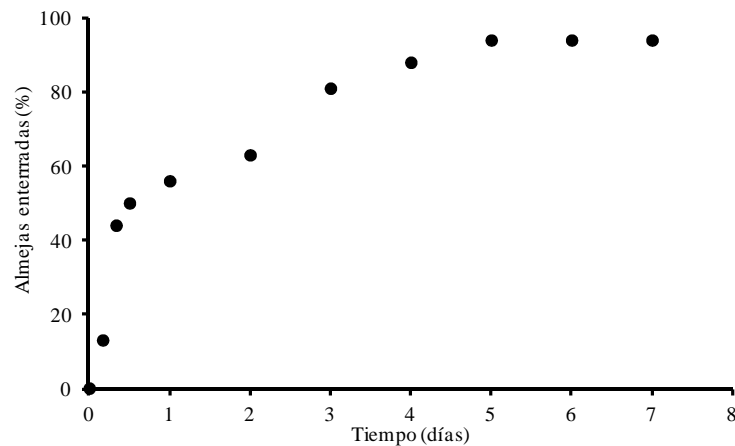


Figura 4.76 Evolución del enterramiento de las almejas durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber sido alimentadas durante 60 días con la microalga Tiso enriquecida con 4,370 μg de Se Kg^{-1}

En cuanto a la supervivencia, en la Figura 4.77 se puede observar como evolucionó en la primera semana del ensayo de depuración, siendo las mortalidades de un 4%.

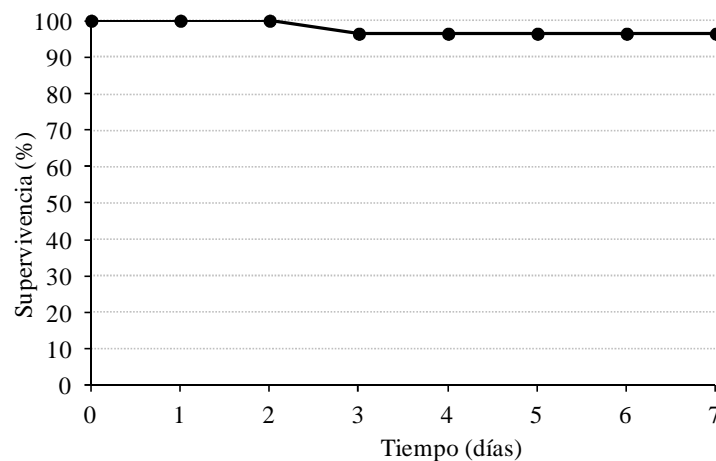


Figura 4.77 Evolución de la supervivencia de las almejas (%) durante la primera semana del periodo de depuración, después de haber sido alimentadas durante 60 días con la microalga Tiso enriquecida con 4,370 μg de Se Kg^{-1}

➤ ***Eliminación del Se en el cuerpo completo***

Los resultados de la eliminación de selenio total en el cuerpo completo de la almeja siguieron una curva exponencial con respecto al tiempo, siendo la concentración final de

selenio $2,60 \pm 0,30 \text{ mg Se Kg}^{-1}$ (en peso seco), ajustándose a modelos cinéticos de primer orden (Figura 4.88).

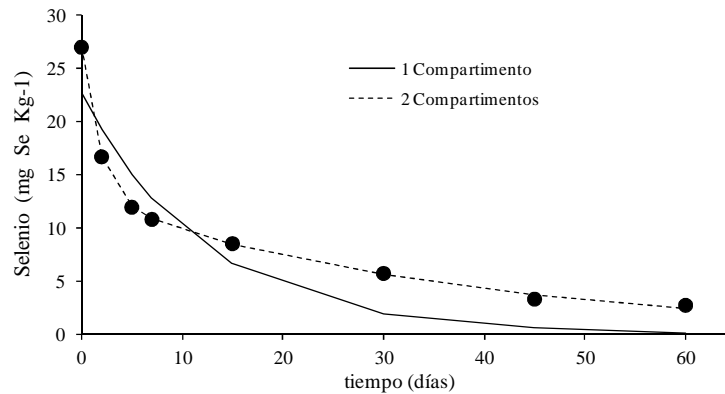


Figura. 4.88 Comparación del contenido de Se (mg Se Kg^{-1} ; en peso seco) observado (●) y predicho en las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos de depuración de 1 compartimiento y 2 compartimentos.

Los resultados mostraron que la concentración de selenio predicha no difiere significativamente con las concentraciones observadas, con coeficientes de correlación 0,918 y 0,999, usando modelos cinéticos de uno y dos compartimentos, respectivamente, ajustándose mejor los resultados con el modelo de dos compartimentos (Tabla 4.23). El tiempo de vida media biológica es de 8 y 23 días usando modelos cinéticos de 1 compartimento y 2 compartimentos, respectivamente, mostrando que el selenio incorporado a través del alimento fue más persistente para la eliminación cuando se ajustaba al modelo cinético de dos compartimentos.

Tabla 4.23. Coeficientes cinéticos para los experimentos de depuración de almejas alimentadas con la microalga Tiso enriquecida con $4,370 \mu\text{g de Se Kg}^{-1}$. ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d1,2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

$[\text{Se}]_i$	Modelo de 1 compartimento		Modelo de 2 compartimentos	
	A		A₁	
36,5	A	22,6	A₁	14,2
	K_d	0,082	K_{d1}	0,568
	t_{1/2}	8	(t_{1/2})₁	1
	R	0,918	A₂	12,8
			K_{d2}	0,027
			(t_{1/2})₂	23
			R	0,999

➤ **Eliminación del Se en los tejidos**

El mismo comportamiento se observó en los tejidos de las almejas, los resultados se muestran en la Tabla 4.24 y Figura 4.89 donde se puede comprobar que el modelo cinético de dos comportamientos se ajustó mejor a los datos observados, con coeficientes de regresión mayores de 0,996 para todos los órganos. Por otra parte, la vida media biológica ($t_{1/2}$) es mayor en el modelo cinético de un compartimento para todos los tejidos, encontrándose el valor de la vida media en el rango comprendido entre 7 y 27 días.

Cuando se usa el modelo cinético de dos compartimentos, al principio se observa una eliminación rápida del selenio, entre 1 y 4 días para todos los tejidos, y posteriormente, la eliminación es lenta, llegando hasta 80 días para las vísceras y las branquias.

Tabla 4.24. Coeficientes cinéticos para el manto, pie, vísceras, branquias y hepatopáncreas durante el experimento de depuración de las almejas alimentadas con la microalga Tiso enriquecida con 4,370 μg de Se Kg^{-1} . ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d,d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}))

	Manto	Pie	Vísceras	Branquias	Hepatopáncreas
1 compartimento					
[Se]_i	13,6	11,3	23,9	49,5	44,9
A	11,0	10,18	19,1	42,5	39,1
K_d	0,058	0,080	0,024	0,039	0,085
t_{1/2}	11	8	27	16	7
R	0,906	0,967	0,880	0,917	0,871
2 compartimentos					
[Se]_i	13,6	11,3	23,9	49,5	44,9
A₁	7,15	6,31	12,2	32,5	30,61
K_{d1}	0,453	0,246	0,238	0,172	0,30
(t_{1/2})₁	1	3	3	4	2
A₂	6,45	4,79	11,56	17,8	14,52
K_{d2}	0,022	0,028	0,008	0,008	0,01
(t_{1/2})₂	29	23	80	80	60
R	0,997	0,996	0,998	0,996	0,995

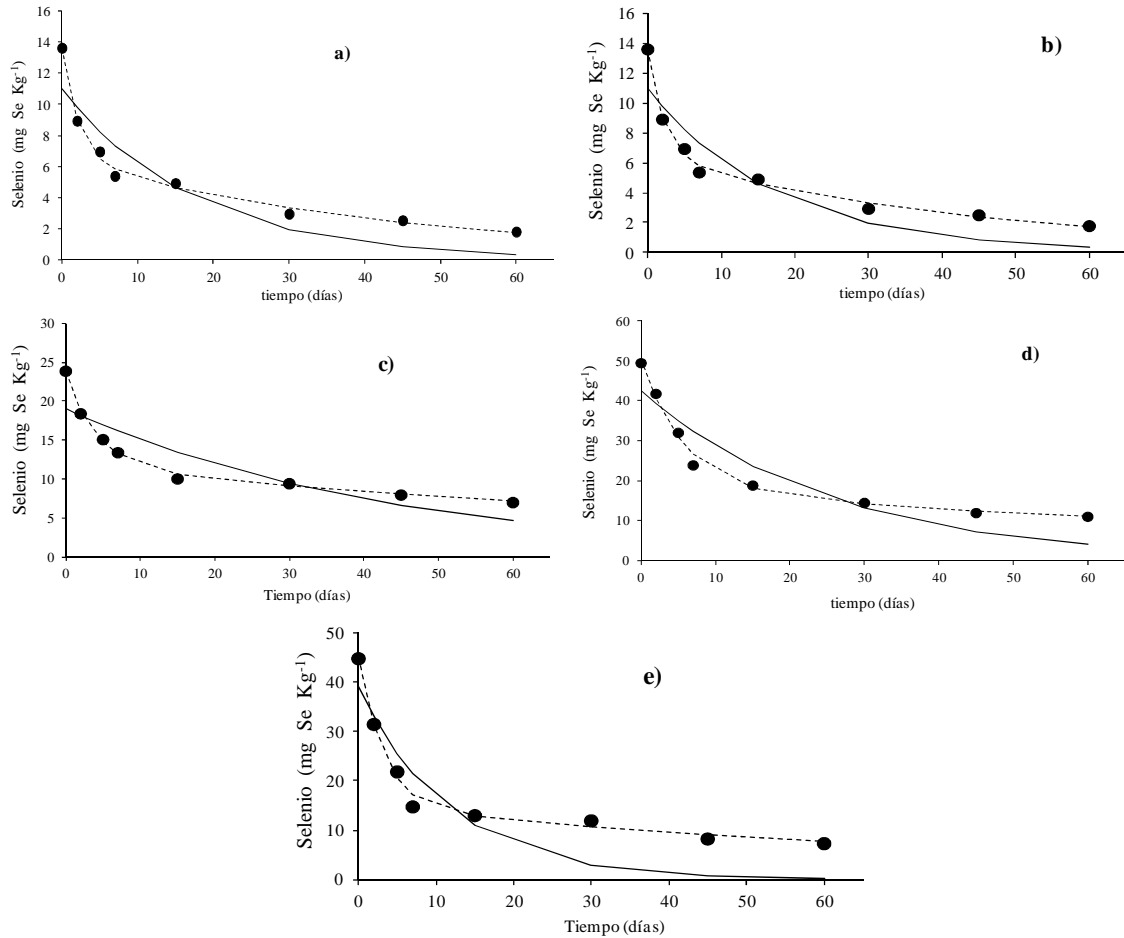


Figura. 4.89 Comparación del contenido de Se (mg Se Kg⁻¹; en peso seco) observado (●) y predicho durante el experimento de depuración de las almejas alimentadas con la microalga Tiso enriquecida con 4,370 μg de Se Kg⁻¹, mediante el uso de los modelos cinéticos de 1 compartimento (línea continua) y 2 compartimentos (línea discontinua). a) Manto; b) Pie; c) Visceras; d) Branquias; e) Hepatopáncreas

➤ *Especiación del Se*

Por último, se determinaron las especies de selenio presente en el cuerpo completo, e igual que en acumulación, las especies que se encuentran en la muestras son Se(IV), SeMetSeCys y cuatro especies desconocidas U1, U2, U3 y U4. Pero la especie desconocida U1, solo se detectó en el muestreo inicial de la depuración, siendo su señal tres veces menor que la de U3 y U4, y 6 veces menor que U1.

Los resultados para todas las especies, tanto identificadas como desconocidas, se ajusta a un modelo cinético de primer orden (Figura 4.90 y Tabla 4.25).

$$U3 < U4 = \text{Se(IV)} < \text{SeMetSeCys} < U2$$

Tabla 4.25. Coeficientes cinéticos para las especies presentes durante el experimento de depuración de las almejas alimentadas con la microalga Tiso enriquecida con 4,370 μg de Se Kg^{-1} . ($A_{1,2}$: concentración de la almeja según la ecuación cinética (mg Kg^{-1}); $K_{d1,d2}$: constantes de eliminación (días^{-1}); $(t_{1/2})_1$: vida media biológica (días); R: coeficiente de correlación; $[\text{Se}]_i$: concentración de la almeja al inicio de la detoxificación (mg Kg^{-1}); (-): no se ajusta al modelo cinético)

	Se(IV)	SeMetSeCys	U2*	U3*	U4*
<i>1 compartimento</i>					
[Se] _i	5,77	2,11	0,661	0,392	0,385
A	5,79	2,09	0,494	0,392	0,370
K _d	0,228	0,107	0,024	0,958	0,224
t _{1/2}	3	6	27	1	3
R	0,999	0,991	0,786	0,997	0,979
<i>2 compartimentos</i>					
[Se] _i	–	–	0,661	–	0,385
A ₁	–	–	0,288	–	0,273
K _{d1}	–	–	0,006	–	0,112
(t _{1/2}) ₁	–	–	102	–	4
A ₂	–	–	0,370	–	0,112
K _{d2}	–	–	0,350	–	8,73
(t _{1/2}) ₂	–	–	2	–	0
R	–	–	0,997	–	0,998

* Área relativa, con respecto a Se(IV)

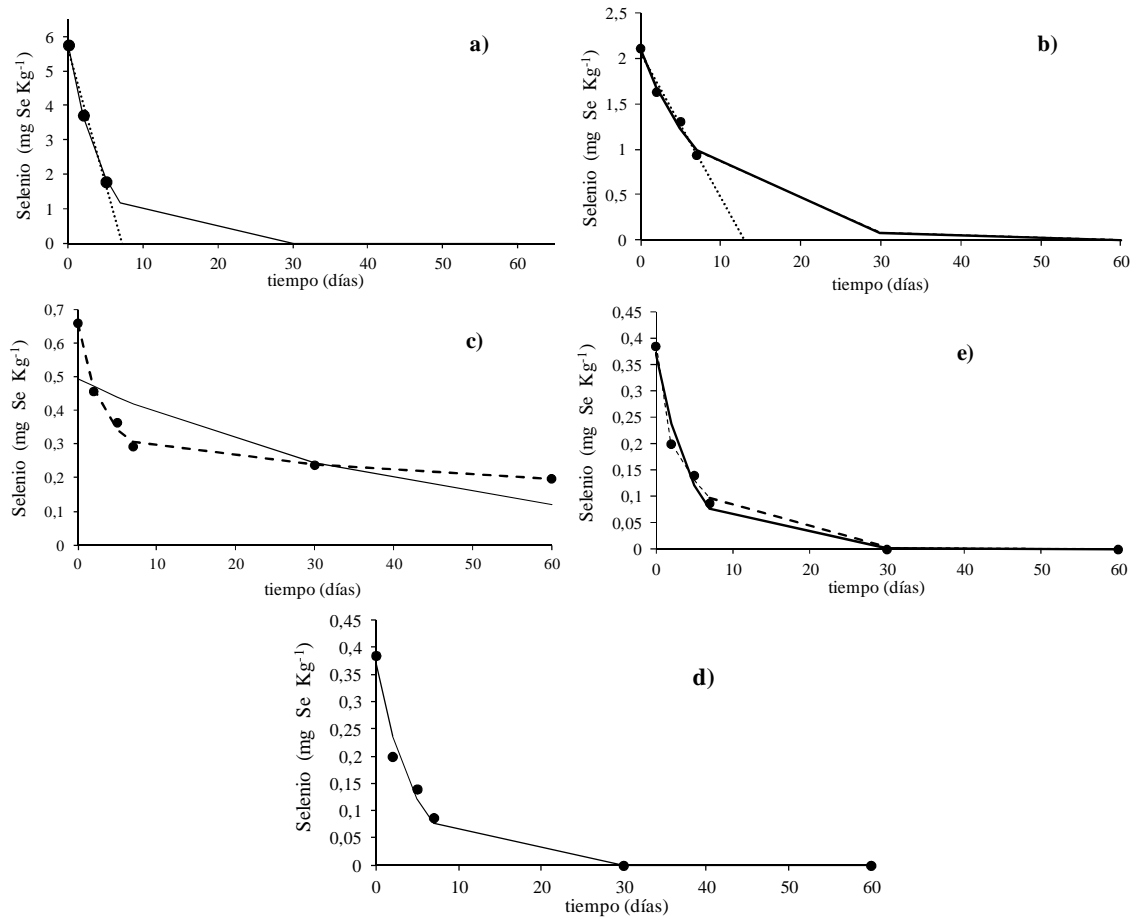


Figura 4.90 Comparación del contenido de especies de Se (mg Se Kg⁻¹; en peso seco) observado y predicho en las almejas durante el experimento de depuración mediante el uso de los modelos de depuración de 1 comportamiento (línea continua) y 2 comportamientos (línea discontinua). a) Se(IV); b) SeMetSeCys; c) U2; d) U3; e) U4

Capítulo 5.

DISCUSIÓN

5.1. BIOACUMULACIÓN DE SELENIO

5.1.1. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Aunque el selenio es un elemento esencial para los moluscos, presente en proteínas y enzimas, es también tóxico cuando las concentraciones son demasiado altas para los requerimientos del animal, en nuestros ensayos fue tóxico para las almejas con el Se(IV) a través del agua con una LC50 (96h) de 885 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, y además, en periodos largos de exposición a través del agua alcanzaron un 100% de mortalidad a partir de las concentraciones de 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet y de 10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys, sin verse afectadas por la exposición al selenio a través de la dieta con Se-Tiso. En la bibliografía no se describen experiencias de mortalidad para organismos marinos con este elemento. Únicamente una especie dulceacuícola, el pez luna-Blugill *Lepomis macrochirus*, ha sido objeto de estos trabajos, constatándose que expuesto a 30 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito alcanza un 100% de mortalidad (Hermanutz *et al.*, 1992).

En nuestro trabajo, se observó que la SeMetSeCys fue más tóxica que la SeMet para las almejas, ya que alcanzaban el 100% de mortalidad con una concentración en el agua menor. Aunque no se disponen de datos de moluscos expuestos a este compuesto, resultados similares de mayor toxicidad de SeMetSeCys respecto a SeMet se han observado en el pez cebra (*Danio rerio*) expuesto a 80 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet y SeMetSeCys (Dolgova *et al.*, 2016).

En general, la tasa de aclaramiento se vio afectada por el selenio en las almejas expuestas a través del agua, apreciándose una disminución en las concentraciones más altas respecto al control a partir de los 7 días, alcanzando una disminución entre el 37-58 % para Se(IV)-1000, SeMet-25 y SeMetSeCys-25 a los 14 días. No viéndose afectando el grupo de almejas expuesto a Se-Tiso. Resultados similares obtuvieron Fournier *et al* (2005a) en la almeja asiática (*C. fluminea*) con la exposición a la SeMet (50 $\mu\text{g Se L}^{-1}$), ya que indujo una fuerte disminución de su tasa de aclaramiento, en cambio respecto al selenito, los resultados fueron distintos a los obtenidos en este trabajo, provocando la exposición un incremento de la tasa de aclaramiento al doble con ambas concentraciones testadas (50 y 500 $\mu\text{g Se L}^{-1}$).

En general, la actividad GST en los individuos expuestos al selenito a través del agua, en todas las especies y dosis contrastadas (5-1000 $\mu\text{g Se L}^{-1}$), fue menor que la actividad en las almejas control. Se han obtenido resultados similares en moluscos gasterópodos, con disminución en la actividad de GST cuando *Nucella lapillus* fue expuesto al sulfato de cobre pentahidrato (Cunha *et al.*, 2007). El caracol Hexaplex (*Murex trunculus*) ha mostrado también una disminución en la actividad de GST cuando se expone al cadmio. La disminución de la actividad de GST después de la exposición a metales pesados puede deberse a la acción directa del elemento sobre la enzima o a la inhibición de GST por las especies reactivas de oxígeno (ROS) extra (Shumilla *et al.*, 1998). Esto se debe a que la GSH tiende a quelarse con el metal pesado antes de que este reaccione con las metalotioneínas, que también pueden causar indirectamente la disminución de la actividad de GST. Los metales también pueden causar agotamiento del sustrato de GSH uniéndolo u oxidándolo (Canesi *et al.*, 1999).

El aumento de la actividad Se-GPx en presencia de selenio se observó en las almejas expuestas al selenito y a la SeMeSeCys, este aumento para combatir el estrés oxidativo durante fagocitosis y/o metabolismo fisiológico, ya se ha descrito en mamíferos y algunas especies de peces (Speier *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1997; El-Bayoumy, 2001; Liu *et al.*, 2004). En moluscos marinos se ha estudiado el efecto del Se sobre la inducción de la Se-GPx frente a los efectos tóxicos de la exposición a mercurio (Chatziargyriou y Dailianis, 2010). Esto se demostró al comprobar un aumento de la actividad de Se-GPx en cultivos celulares tratados con selenio, por lo que se confirmó la teoría de que el Se juega un importante papel como co-factor para el incremento de la actividad Se-GPx. En nuestro trabajo se obtuvo un patrón similar, aumentando los valores de Se-GPx en los tratamientos con Se, por lo que se puede afirmar que en la almeja fina la alimentación con Se intensifica la actividad de Se-GPx. En ese sentido, según nuestros resultados con los enzimas antioxidantes, se puede afirmar que la actividad Se-GPx es el principal mecanismo para combatir el estrés oxidativo derivado de la exposición a dosis elevadas de selenio en *R. decussatus*.

5.1.2. BIOACUMULACIÓN DE Se A TRAVÉS DEL AGUA

5.1.2.1. Selenio total en el cuerpo completo

Respecto a las concentraciones de selenio total en el cuerpo completo obtenidas en *R. decussatus* durante el experimento, en general, mostraron un aumento de la concentración de selenio acumulado cuando aumentaba la concentración de exposición. Esta relación también ha sido observada por otros autores, en *Corbicula fluminea* expuesta a SeMet a través del agua (Adam-Guillermin *et al*, 2009), así como en la correlación positiva encontrada entre los niveles de Pb, Cd, Ni y Co en la ostra *Crassoarea corteziensis* y los niveles en el medio marino (Paez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990)

Una de las suposiciones importantes del modelo de BCFs es que refleja las condiciones de equilibrio entre la exposición y las concentraciones en el organismo, que se verifica para exposiciones en laboratorio (BCFs), aunque en condiciones naturales (BAFs) pueden no cumplirse este supuesto (MacGeer *et al*, 2003). Teniendo en cuenta las distintas especies suministradas a través del medio acuático, cabe destacar las diferencias entre ellas respecto a los factores de bioconcentración como se observa en la Figura 5.1. Los valores de BCFs más elevados al comparar las distintas especies de selenio administradas nos indican una mayor capacidad del organismo para acumularla, con una mayor facilidad de entrada en el organismo de esa especie determinada.

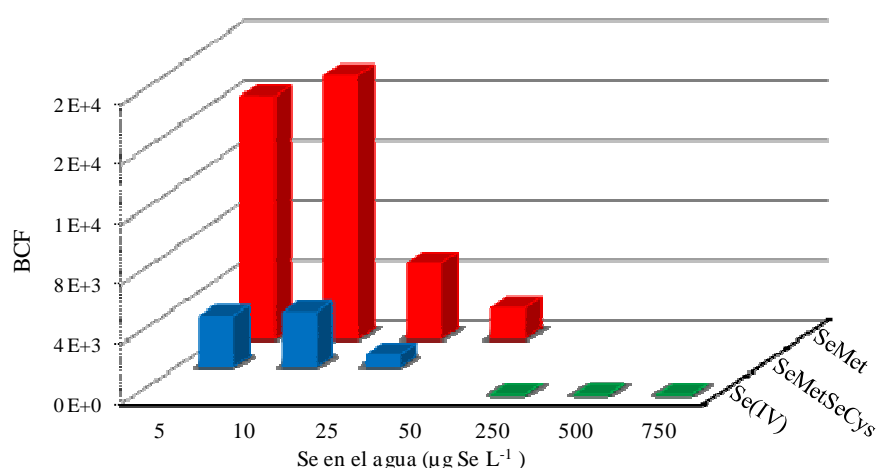


Figura 5.1 Comparación de los valores de BCF entre los diferentes tratamientos usados en las almejas expuestas a distintas concentraciones de selenito, SeMet y SeMetSeCys en el agua de cultivo durante 120 días.

La especie de selenio que menos se acumula es el selenito, que presenta los valores más bajos de BCFs. Estos valores en *R. decussatus* para el selenio son menores y más constantes que los referidos en trabajos realizados sobre exposición a metales, como se puede observar en los valores de BCF con un rango entre 29 y 604, en la exposición al cobre, cadmio o plomo a través del agua (Blasco y Puppo, 1999; Freitas *et al.*, 2014).

Los compuestos orgánicos presentaron respecto a las almejas expuestas al selenito, una mayor acumulación de selenio, con BCFs mayores, y siendo además mayores para SeMet que para SeMetSeCys. En estas especies se refleja una relación inversa entre los factores de bioconcentración BCFs y la concentración de exposición a través del agua, decreciendo el BCF cuando aumenta la concentración en el agua. Esto es consecuente con el análisis realizado por McGeer *et al.* (2003) sobre la relación de BCFs (en laboratorio) y la concentración de metales en medio acuático. Existen múltiples mecanismos potencialmente responsables de una relación inversa entre el factor de acumulación y la concentración de exposición, los cuales son específicos del metal y de las especies (DeForest *et al.*, 2007). Estos mecanismos incluyen la regulación activa, la influencia de las concentraciones naturales y la cinética de absorción con saturación a concentraciones elevadas (White y Rainbow, 1982; Borgmann y Norwood, 1995 y Simkiss y Taylor, 1989). En este trabajo, la concentración de Se aumenta con la exposición, aunque la acumulación interna no aumenta tan rápidamente como los niveles de exposición y, por lo tanto, se confirma un grado significativo de control sobre la acumulación de Se. Esto ha sido descrito por otros autores con respecto a otros elementos traza, como el Cu o el Zn en algunos organismos marinos y/o de agua dulce (Alsop y Woos, 2000; McGeer *et al.*, 2003).

Las constantes de eliminación del selenito fueron significativamente más altas, 15 veces mayores que las de acumulación para todas las concentraciones testadas, lo que implicó una eliminación muy rápida del selenio. En cambio, en las especies orgánicas siempre fue significativamente menor que la constante de absorción, en ambas especies y para todas las concentraciones testadas, excepto para 25 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys, donde ambas constantes fueron iguales. Estas diferencias en la dinámica de eliminación del selenio revelaron una regulación diferente de la *R. decussatus* ante la exposición a las distintas especies de selenio. Dichas diferencias son similares a las que se observan entre distintos elementos esenciales, como refieren Borgmann *et al.* (1993) para el anfípodo *Hyaella*

azteca, en el que observaron diferencias en los coeficientes cinéticos entre los metales esenciales Cu y Zn, con una K_d mucho mayor en el Zn. Por lo tanto, la almeja podría regular activamente la carga de Se en el tejido a las concentraciones de selenito disuelto equilibrando la excreción y absorción, o en el caso de bajas exposiciones de Se(IV) disuelto, la diferencia entre las tasas de absorción y excreción es tan pequeña que no hay acumulación neta significativa. Esto último podría haber ocurrido en las almejas expuestas a 5 y 20 $\mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, en las que el selenio acumulado estuvo por debajo del límite de detección.

La constante de absorción para el selenito fue del mismo orden de magnitud que la descrita por Wang (2001) para la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), ($0,009 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$), y menores que para los mejillones *Perna viridis* ($0,019 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y *Septifer virgatus* ($0,031 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Sin embargo, la constante de absorción obtenida para la SeMet ($0,478 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) fue mucho mayor que la obtenida por Adam-Guillermin (2009) para la almeja asiática *C. fluminea* ($0,0115 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$). En ambas especies de selenio orgánico, la constante de absorción fue siempre mayor que la de eliminación, pero presentó una disminución significativa al aumentar la concentración de selenio en el medio, llegando a ser esta relación solo del doble para la SeMet y no existir para SeMetSeCys, por lo tanto la eliminación del selenio en las almejas expuestas a ellas fue más lenta que en Se(IV).

La bioacumulación refleja diferentes estrategias de desintoxicación (Wallace y Luoma, 2003), mientras que algunos organismos son reguladores y evitan que los metales entren o los expulsan eficientemente una vez que se han absorbido, otros son acumuladores que, por ejemplo, sintetizan ligandos que se unen a los metales. Los acumuladores tienden a presentar cargas elevadas en el cuerpo, que es generalmente el caso de los bivalvos. Los resultados obtenidos por Adam-Guillermin *et al.* (2009) para *C. fluminea* confirman esta hipótesis, ya que las constantes de velocidad de absorción para la SeMet fueron significativamente más altas que las constantes de velocidad de depuración, lo mismo que se observó para la almeja fina expuesta a SeMet a través del agua en este trabajo.

Esta elevada bioconcentración de SeMet puede estar ligada a tasas de absorción muy alta y/o a que la entrada de selenio deriva en su transformación en especies orgánicas, y podría explicarse por una bioacumulación inadvertida de SeMet directa a proteínas en lugar de

metionina, hecho que se ha demostrado en otras especies de bivalvos que la acumulan a través de un sistema de transporte activo (Stewart, 1978).

La relación observada entre niveles de exposición-cantidad de selenio acumulado y la respuesta fisiológica de la almeja pone de manifiesto que concentraciones elevadas de selenito, selenometionina o selenometilselenocisteína en el agua aumenta la cantidad de selenio activo biológicamente y provoca daños fisiológicos en las almejas.

5.1.2.2. Selenio total en los tejidos

La acumulación de selenio en los tejidos tiene un comportamiento similar al expuesto para el organismo completo, siendo la acumulación mayor en hepatopáncreas y branquia, con sus valores de BCFs mayores que en el resto de los tejidos para todas las especies de selenio testadas (Figura 5.2).

La diferente absorción de un elemento por distintos órganos o tejidos se interpreta como el resultado de la actividad fisiológica específica de cada uno. El uso más importante de estos modelos cinéticos es el cálculo de la concentración en el órgano crítico (es decir, el órgano más sensible) bajo diversas condiciones de exposición, mientras que las concentraciones de elemento en otros órganos o tejidos proporcionan una indicación de los efectos adversos (Elder *et al.*, 2015).

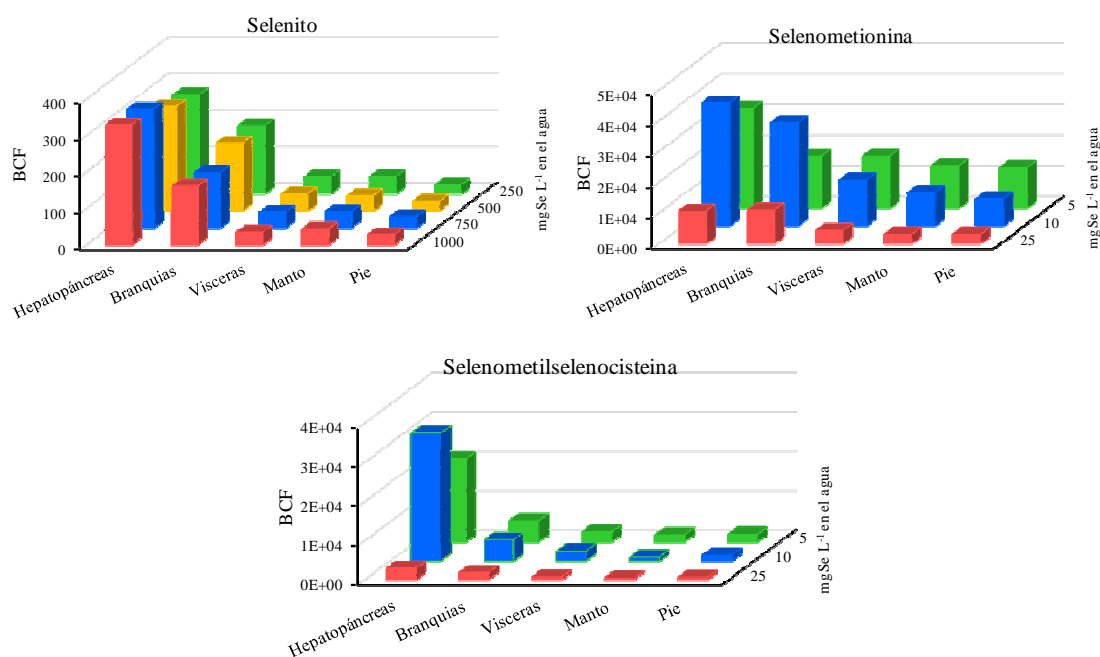


Figura 5.2 Comparación de los BCFs en los diferentes tejidos de las almejas expuestas a distintas concentraciones de selenito, SeMet y SeMetSeCys en el agua de cultivo durante 120 días.

La distribución del Se entre los diversos tejidos está determinada por su superficie de adsorción, por lo tanto las branquias con una gran superficie y las propiedades químicas de las mucosas que las cubren es responsable de la captura de metales en forma disuelta y en forma de partículas presentes en el agua que fluye a través de la cavidad del manto mostrando un mayor grado de acumulación (Cunningham, 1979; Amiard-Triquet *et al.*, 1986). Así mismo, la elevada concentración encontrada en el hepatopáncreas se debe además de a la absorción directa, al hábito de alimentación por filtración de las almejas.

La acumulación de selenio en los distintos tejidos al final de la exposición fue en el siguiente orden:

$$\text{Manto} = \text{Pie} < \text{Víscheras} < \text{Branquias} < \text{Hepatopáncreas}$$

La distribución de Se en los tejidos de otros bivalvos también tuvo una clara diferenciación, aunque varió en algunos respecto al tejido que más acumulaba, siendo en el mejillón de agua dulce *Unio mancus* (Italia), branquia > hepatopáncreas > manto = pie > vísceras = músculo abductor (Poletini *et al.*, 2015); en el berberecho *Anadara trapezia* (Australia), branquias > hepatopáncreas ≥ hemolimfa (Taylor y Maher, 2012 a) o branquias > gonadas-intestino > manto > pie (Jolley *et al.*, 2004); en la almeja *Puditapes*

philippinarum (China), viscera≈branquia > manto > gónadas > músculo (Zhang *et al.*, 1990) y en la ostra *Ostrea edulis* (Inglaterra), la glándula digestiva contenía la mayor concentración de Se, mientras que el músculo aductor y el pie contenían la más baja (Wrench, 1979).

En los tejidos de las almejas expuestas a las distintas especies de Se, como se puede observar en la Figura 5.2, hubo una disminución en los BCFs según aumenta la concentración de exposición en el agua, excepto en el caso del selenito que mantuvieron sus valores más constantes. Los compuestos orgánicos presentaron respecto a las almejas expuestas al selenito, una mayor acumulación de selenio en los tejidos, con BCFs mayores, y siendo además mayores para SeMet que para SeMetSeCys.

La evolución de los coeficientes cinéticos fue similar al expuesto para el cuerpo completo, pero resaltando que en branquias y hepatopáncreas fue siempre mayor la constante de absorción y menor la de eliminación que en el resto de los tejidos para todas las especies y concentraciones de selenio (excepto en SeMetSeCys que la de eliminación fue similar al resto de tejidos), lo que demuestra que estos tejidos fueron capaz de acumular selenio más rápido que el resto.

Resultados similares a los nuestros obtuvieron Fournier *et al.* (2005 a) en estudios sobre la bioacumulación en la almeja asiática dulceacuícola *C. fluminea*, a partir de selenio disuelto como selenito, selenato o selenometionina, siendo la SeMet disuelta la especie más bioacumulada a nivel de órganos, después el selenato y el selenito, y siempre más en branquias que en vísceras, manto o músculo.

5.1.3. BIOACUMULACIÓN DE Se DESDE LA DIETA

Los altos resultados obtenidos en la eficiencia de absorción de Se (> 68 %) en las almejas *R. decussatus* alimentadas con Tiso enriquecidas con distintas concentraciones de Se fueron similares a los obtenidos por otros autores en otras especies de almejas como *M. balthica*, *R. philippinarum*, *M. mercenaria*, *Potamocorbula amurensis* o *C. fluminea* alimentadas con *Thalassiosira pseudonana* *I. galbana* o *Phaeodactylum tricornutum* enriquecidas con selenio radioactivo ⁷⁵Se (Zhang *et al.*, 1990; Luoma *et al.*, 1992; Reinfelder *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2006) y en otros bivalvos como ostras *C. rivularis* o *S.*

glomerata (Ke y Wang *et al*, 2001), mejillones, *Mytilus edulis*, *Perna viridis* (Wang *et al.*, 1995; Schlekot *et al.*, 2002).

Por otra parte, la relación de ingesta en *R. decussatus* en este trabajo son del mismo orden, aunque algo mayores que los obtenidos para otros bivalvos (Luoma *et al.*, 1992; Zhang, 1990; Reinfelder *et al*, 1997; Ke y Wang, 2001; Lee *et al.*, 2006), mejillones *Mytilus edulis*, *Perna viridis* (Wang *et al.*, 1995; Schlekot *et al.*, 2002). Dichas diferencias pueden deberse a que se trata de especies diferentes.

En cuanto a la constante de eliminación, los valores son similares a los obtenidos por otros autores en bivalvos cuando las almejas se alimentan con las microalgas a concentraciones por encima de $2,18 \mu\text{g Se g}^{-1}$ (Luoma *et al.*, 1992; Reinfelder *et al.*, 1997).

Los valores de TTF obtenidos en el presente trabajo, comprendido entre 3,7 y 16, se encuentran dentro del rango de otros bivalvos (Tabla 5.1) (Zhang *et al*, 1990; Luoma *et al*, 1992; Reinfelder *et al*, 1997; Ke y Wang, 2001; Lee *et al* 2006), mejillones, *Mytilus edulis*, y *Perna viridis* (Wang *et al*, 1995; Schlekot *et al.*, 2002) y al tener un valor mayor que 1 indica que hay biomagnificación (Reinfelder *et al*, 1998)

Todo esto indica la alta biodisponibilidad (acumulación) de selenio desde las partículas ingeridas (alimento) a los invertebrados. También, se ha observado este comportamiento en estudios ambientales en la bahía de San Francisco con la almeja *M. balthica* (Luoma *et al.*, 1992).

En general, esto revela que el selenio se concentra más en los tejidos de las almejas que en las microalgas de las que se alimenta y se puede justificar por sus elevadas eficiencias de asimilación y bajas velocidades de eliminación

Tabla 5.1. Coeficientes cinéticos para *Ruditapes decussatus* durante el periodo de exposición (120 días) alimentada con distintas concentraciones de Se-Tiso y de otras especies de mouscosos bivalvos.

Especies	Alimento (microalga)	AE (%)	IR (g · día ⁻¹ · g ⁻¹)	K _e (día ⁻¹)	TTF	Referencia
<i>R. decussatus</i>	<i>I. galbana</i>	68 - 78	0,70 - 0,74	0,031-0,129	3,75 - 16,5	En este trabajo
<i>P. amurensis</i>	<i>Cryptomonas</i> sp, <i>P. tricornutum</i> , <i>Synechococcus</i> sp, <i>Thalassiosira</i> sp.	36 - 80	0,25	0,025	3,6 - 8,0	Schlekat <i>et al.</i> , 2004 Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>C. fluminea</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	29 - 81	0,05	0,010	1,45 - 4,05	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>M. balthica</i>	<i>T. pseudonana</i>	22 - 86	0,25	0,012 -0,030	4,5 - 11,2	Luoma <i>et al.</i> , 1992
<i>R. philippinarum</i>	<i>S. costatum</i> , <i>C. muelleri</i> , <i>P. tricornutum</i>	52 - 70	0,25	0,013	10 - 13,5	Zhang <i>et al.</i> , 1990
<i>M. mercenaria</i>	<i>I. galbana</i> , <i>T. pseudonana</i>	92	0,25	0,010	23	Reinfelder <i>et al.</i> , 1997
<i>C. virginica</i>	<i>I. galbana</i> , <i>T. pseudonana</i>	45 - 70	0,25	0,069	1,6 - 2,5	Reinfelder <i>et al.</i> , 1997
<i>M. edulis</i>	Phytoplankton, <i>I. galbana</i> , <i>T. pseudonana</i>	31 - 72	0,27	0,022	3,8 - 8,8	Want <i>et al.</i> , 1996; Reinfelder <i>et al.</i> , 1997

5.1.4. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL SELENIO

La distribución subcelular de selenio en los bivalvos puede ser diferente dependiendo de la especie del bivalvo, especie de selenio, vía de entrada y del propio tejido. En este trabajo se evaluó la distribución subcelular del selenio en branquia y hepatopáncreas en almejas *R. decussatus* expuestas a 500 µg Se L⁻¹ de selenito, 10 µg Se L⁻¹ de SeMet, 10 µg Se L⁻¹ de SeMetSeCys y alimentada con 4,37 µg Se Kg⁻¹ de Se-Tiso. En la bibliografía existen algunos estudios sobre la distribución subcelular de selenio en otros bivalvos (Taylor y Maher. 2012 y 2014; He y Wang, 2013).

Las recuperaciones de selenio en las fracciones subcelulares con respecto a la concentración total en el tejido fueron cuantitativas para las almejas expuestas a las distintas especies de selenio a través de agua o a través del alimento. Similares resultados fueron obtenido por Adam-Gullermin *et al.* (2009), mientras que otros autores no obtuvieron recuperaciones cuantitativas (31-75%) (Taylor y Maher. 2012 y 2014).

Un porcentaje alto de selenio se detectó en la fracción biológicamente detoxificada en las branquias de las almejas expuestas con las distintas especies de selenio y alimentada con Se-Tiso, mientras que en hepatopáncreas se distribuye principalmente entre esta fracción y los núcleos y desechos celulares. Estos resultados difieren de los obtenidos por Taylor y Maher (2012) para el Se en branquias y hepatopáncreas de *A. trapezia*, y en el cuerpo completo en *T. deltoidalis* donde obtienen que el selenio se asociaba a los núcleos y desechos celulares (Taylor y Maher, 2014).

En general, como se observa en la Figura 5.3, comparando la distribución subcelular en branquias y hepatopáncreas de los individuos alimentados durante 30 días con las distintas especies de Se a través del agua y de la dieta, se apreció en branquia una mayor fracción detoxificada biológicamente, y menores fracciones activas biológicamente y de núcleos y desechos celulares.

El selenio de la fracción biológicamente detoxificada se asocia principalmente a las proteínas estables al calor. Esto aún no ha sido descrito en organismos marinos, pero en mamíferos hay estudios que sugieren que el selenito induce las metalotioneínas (Chen y Wanger, 1994). La mayoría del selenio no asociado con las selenoproteínas de la familia de la glutatión peroxidasa se encontraría unido a selenoaminoácidos y otros compuestos de selenio de bajo peso molecular análogos a metalotioneínas actuando como almacén y transporte de proteínas y, por lo tanto, serían intermediarios en la síntesis de selenoproteínas (Akesson y Srikumar, 1994). Por consiguiente, esta fracción puede representar una reserva de selenio detoxificado.

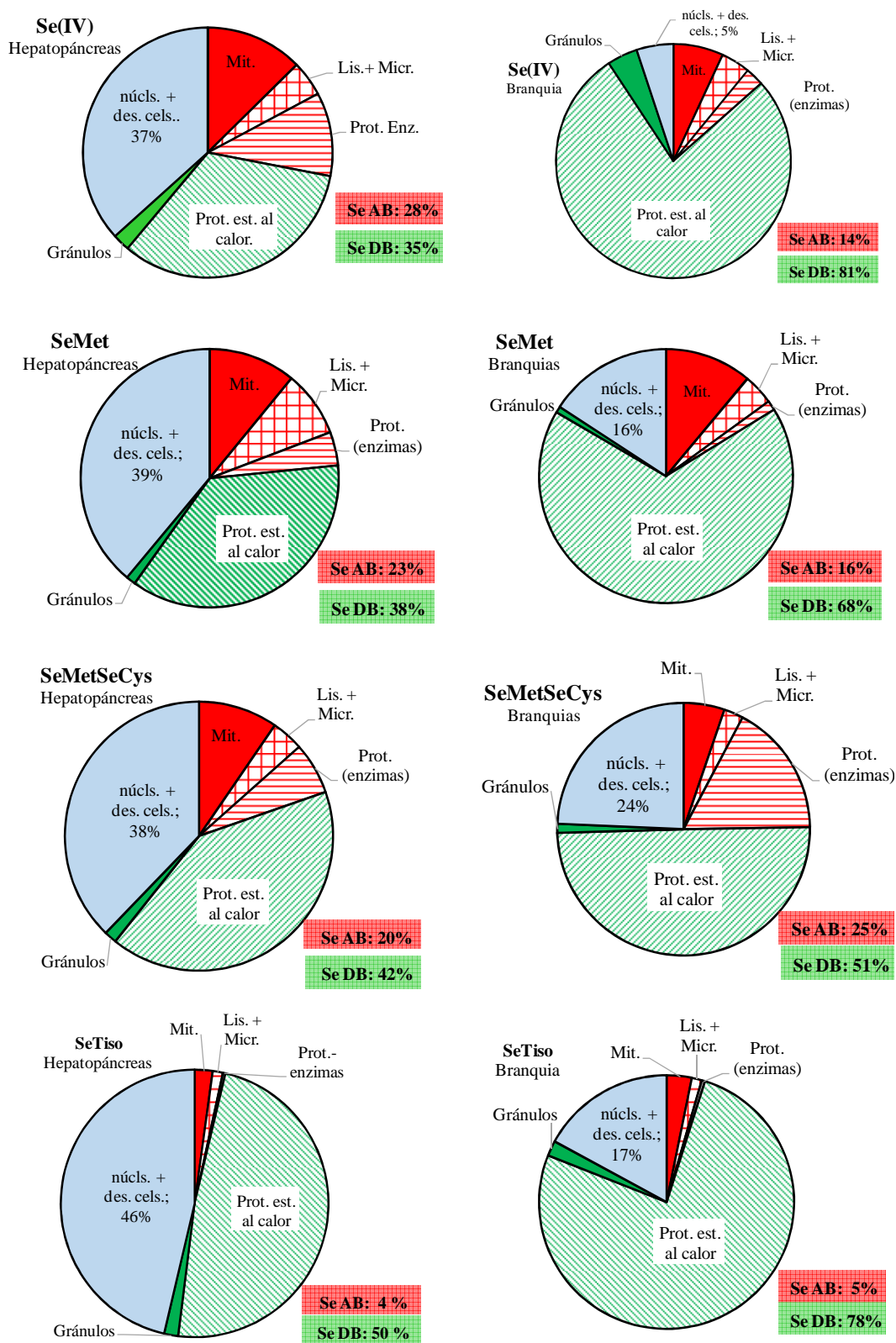


Figura 5.3. Comparación de la distribución (%) de selenio en cada fracción subcelular de *R. decussatus* después de 30 días de exposición a las distintas especies de selenio. Las fracciones subcelulares son: gránulos, núcleos y desechos celulares (núcl. + des. cel.), proteínas estables al calor (prot. est. al calor), mitocondria (mit.), lisosomas y microsomas (lis. + micr.) y proteínas-enzimas (prot.(enzimas)). n = 2. (Se AB: fracción activa biológicamente en tonos rojos, y Se DB: fracción detoxificada biológicamente en tonos verdes, en el diagrama).

El selenio asociado a los gránulos supuso solo entre 1-2% en las branquias y hepatopáncreas de las almejas para todos los tratamientos. Estos resultados son similares a los obtenidos en insectos por Dubois y Hare (2009), sin embargo son menores a los obtenidos por otros autores en otros organismos marinos (Zhang y Wang, 2006; Taylor y Maher, 2012 y 2014).

Por otra parte, un porcentaje entre el 5 y 46% de selenio total se distribuyó en la fracción de desechos celulares, siendo mayor en hepatopáncreas que en branquias. Según Wallace *et al.* (2003), los desechos celulares son los más funcionales ya que contienen fragmentos de tejido, membranas celulares y otros componentes celulares de función desconocida. Por ejemplo, la unión del metal a las membranas celulares podría resultar tóxica, sin embargo, la unión a fracciones menos sensibles dentro de los desechos celulares podría impedir la unión a componentes sensibles de la célula (Lucu & Obersnel, 1996).

El selenio biológicamente activo se encontró entre el 4% y el 28% para ambos tejidos, siendo el porcentaje menor para los tejidos de las almejas alimentadas con SeTiso. Estos resultados son similares a otros autores (Taylor y Maher, 2014; Dubois y Hare, 2009), mientras que son inferiores a los obtenidos por Taylor *et al.* (2012) para el Se en la almeja arca *Anadara trapezia*. Un porcentaje alto del selenio activo biológicamente se encuentra en las mitocondrias, donde tiene lugar la reducción del oxígeno y la producción de la energía celular a través de la enzima glutatión peroxidasa, siendo el selenio un componente esencial de esta enzima, sin embargo, el selenio puede ser tóxico por encima de la concentración que se requiere (Palace *et al.*, 2004).

El porcentaje de selenio en la fracción de lisosomas y microsomas fue inferior al 10% para todos los tratamientos, donde el componente microsomal de las células induce la fragmentación del retículo endoplasmático, que es responsable de transportar y sintetizar proteínas, por lo tanto el selenio en esta fracción se asocia más con los microsomas que con los lisosomas, lo cual podría ser indicativo de su esencialidad aunque podría igualmente tener también implicaciones para su toxicidad (Bonneris *et al.*, 2005).

En la fracción de proteínas enzimáticas el porcentaje de selenio fue bajo, menor del 10%, excepto en la branquias de las almejas expuestas con SeMetSeCys que es el 20%, en esta fracción se encuentran enzimas, proteínas de bajo peso molecular y otras moléculas que

son sensibles a metales estando el selenio asociado con proteínas complejas (Wallace *et al.*, 2003).

Por otra parte, el porcentaje de selenio citosólico, siendo la suma del selenio de la fracción de proteínas enzimáticas y proteínas estables al calor, se encontró entre 41-49% y 67-80% para las branquias y hepatopáncreas de todos los tratamientos, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Adam-Guillernmin *et al.* (2009) en branquias de bivalvos y mayores que los obtenidos por otros autores (Taylor y Maher. 2012)

Por último, algunos autores (Wallace y Luoma., 2003 y Wallace *et al.*, 2003) han mostrado que la distribución de metales y metaloides en el alimento (presa) altera directamente la transferencia trófica a los depredadores.

La distribución subcelular de un compuesto dentro de un organismo además de servir para interpretar su toxicidad o tolerancia, también se puede utilizar para la evaluación de su transferencia trófica a sus depredadores. Los compuestos que se encuentran unidos a la fracción no detoxificada (lisosomas, mitocondrias, enzimas) son más biodisponibles a los depredadores que los compuestos unidos a la fracción detoxificada. En este sentido Wallace y Luoma (2003) propusieron el concepto de la fracción de metal biodisponible tróficamente (TAM) combinando orgánulos, proteínas enzimáticas y proteínas estables, e indicaron que alrededor de 100% del TAM debe ser asimilado por el depredador. Los resultados de este trabajo muestran que la biodisponibilidad trófica de selenio se encuentra entre el 70-80% y 50-53% en hepatopáncreas y branquias, respectivamente, para todos los tratamientos de este estudio.

Pero sobre la biodisponibilidad dentro de la distribución subcelular hay puntos de vista contradictorios. En la revisión efectuada por Wang (2013), sobre los estudios realizados en los últimos años para examinar la utilidad de la TAM en la predicción de la transferencia trófica de metales, según sus observaciones los resultados suelen ser más cautelosos que ciertos (Rainbow *et al.*, 2011). Por ejemplo, la definición de la TAM excluye los restos celulares y las fracciones gránulos, pero los estudios utilizando fracciones purificadas han demostrado que los metales en estas dos fracciones pueden estar también biodisponible a los depredadores (Zhang y Wang, 2006; Cheung y Wang, 2005).

Sin embargo, puede tener sentido que cada una de estas fracciones se diferencien en el grado de biodisponibilidad y que la TAM sea más biodisponible cuando en ambas hay selenio.

5.2. Eliminación del selenio

La tasa de enterramiento y la mortalidad en la depuración mostró que los grupos que presentaron mejores condiciones fueron las almejas expuestas previamente a la T-Iso y a la SeMetSeCys, con una mortalidad durante la primera semana del 4 y 20%, respectivamente, y una TE(50) para ambas de 12 h, siendo las que alcanzaron el proceso de depuración en peor estado las expuestas previamente a SeMet, con un 85% de mortalidad y una TE(50) entre las 48-72 h.

La eliminación de Se bifásica que se observó en los modelos cinéticos, tanto en el cuerpo completo como en los tejidos de las almejas expuestas a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys y alimentadas con $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ de Se-Tiso, indicó la existencia de dos conjuntos metabólicos de Se dentro de las almejas. Esto se ha llegado a justificar en otros organismos como un conjunto de Se inorgánico (menos persistente) y otro de Se orgánico (más persistente) (Kleinow and Brooks, 1986 a; b), llegando a demostrar que la SeMet (que puede ser representativa del conjunto orgánico) tiene un tiempo de vida media más largo que las formas inorgánicas.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 5.4, la eficiencia de retención no varió entre los distintos tratamientos, reteniéndose en la almejas entre el 9 y 24% del Se inicial al final de la fase de depuración (60 días). Cuando la entrada de selenio fue a través del alimento, se observó que la eficiencia de retención de selenio a los 8 días de depuración en las almejas era aproximadamente el 33 %, similares a los obtenidos en otros bivalvos (19-45%) por otros autores (Wang *et al.*, 1996; Reinfelder *et al.*, 2001; Ke y Wang, 2001; Alquezar *et al.*, 2007).

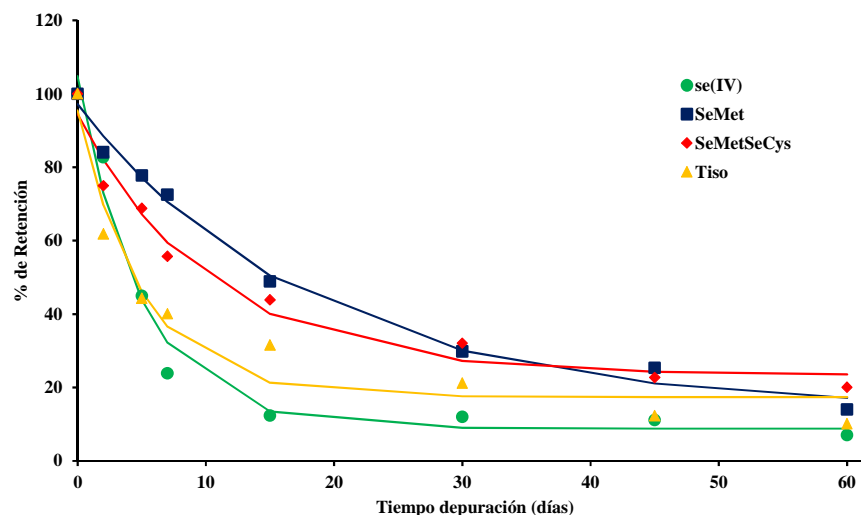


Figura 5.4. Retención de selenio durante de 60 días de depuración en *R. decussatus* expuesta a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys y alimentadas con $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ de Se-Tiso (coeficiente de regresión, R>

La vida media biológica de selenio en el compartimento de corto plazo fue entre 1 y 3 días en el cuerpo entero de las almejas de los distintos tratamientos estudiados en este trabajo, excepto para las almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, que es 10 días indicando un alto porcentaje de retención (alrededor del 62%). En el caso de los tejidos, la vida media biológica de selenio se situó entre 1 y 6 días para todos los tejidos.

La vida media biológica de selenio en el compartimento a largo plazo fue entre 23 y 46 días para las almejas expuestas a especies de selenio orgánicas y alimentadas con Se-Tiso. En concreto, para las almejas alimentadas con Se-Tiso, la vida media biológica fue de 23 días, y tal como se ha descrito en otros bivalvos (10-35 días) por otros autores (Wang *et al.*, 1996; Reinfelder *et al.*, 2001; Ke y Wang, 2001; Alquezar *et al.*, 2007). En el caso de los tejidos, la vida media biológica en el compartimento de larga vida fue 3 veces mayor en el manto (98-106 días) que en los otros tejidos en almejas expuestas a especies de selenio orgánicas, mientras que en las almejas expuestas a Se(IV) fueron dos veces mayor en el hepatopáncreas (51 días) que en las branquias. Para las almejas alimentadas con Se-Tiso, la vida media biológica fue 2,5 veces mayor en las branquias, hepatopáncreas y vísceras (60-80 días) que en el manto y pie. Okazaki y Panietz (1981) obtuvieron, en ostras, que el tiempo de vida media biológica fue entre 108-164 días, 65-171 días y mayor de 300 días, en manto, hepatopáncreas y branquias respectivamente.

5.3. Especiación del selenio

Según nuestro estudio, en los experimentos de incorporación del selenio a través del agua y del alimento, se identificaron tres especies conocidas Se(IV), SeMet, SeMetSeCys y 4 especies desconocidas (U1, U2, U3, U4).

La concentración de SeMet en el tejido de las almejas se encontró por debajo del límite de detección en todos los grupos de almejas expuestas al selenio a través del agua, excepto para los grupos expuestos a SeMet, indicando que el mecanismo metabólico del selenio en animales no puede sintetizar SeMet por medio de otras especies. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en organismos acuático como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando se alimenta con levadura enriquecida con selenito (Godin *et al.*, 2015)

Para las almejas expuestas con SeMet, el 46 % de selenio total fue identificado como SeMet. Además, se observa una buena correlación entre la concentración de SeMet en el agua y en el cuerpo entero de la almeja ($R=0,839$). Similares resultados han sido obtenidos por Godin *et al.* (2015) confirmando la conclusión de Whanger *et al.* (2002) sobre la significancia de la SeMet, encontrándose principalmente intacta después de la ingestión, según Waschulewski y Sunde (1988) en el caso de dietas con bajo contenido en metionina como las dietas compuestas por plantas, y en el presente trabajo la dieta es solamente SeMet. Tampoco se observó la presencia de SeMet en las almejas alimentadas con Tiso enriquecida con selenio (la dieta $4,37 \text{ mg Kg}^{-1}$ microalgas contiene $1,1 \text{ } \mu\text{g Se kg}^{-1}$ de SeMet). Este resultado puede explicarse por el hecho de que la concentración de SeMet biodisponible cuando el aporte de SeMet es $46 \pm 6 \%$ (respecto a la concentración de selenio total) se encuentra por debajo del límite de detección ($2,5 \text{ mg Kg}^{-1}$). Esta especie ha sido identificada por otros autores en organismos acuáticos como salmones (*Salmo salar*) (Bryszewska y Mage, 2015); mejillones (*Mytilus edulis*) (Bryszewska y Mage, 2015), artemias (Fan *et al.*, 2002) en medios naturales incorporado mediante microalgas o agua, o en bagres africanos (*Clarias garepinus*) alimentados con ajos enriquecidos con selenio (Schram *et al.*, 2008).

La concentración de Se(IV) se situó por debajo del límite de detección en el grupo de almejas alimentadas con Tiso enriquecida con selenio, mientras que se detectó la presencia de Se(IV) en los otros grupos de almejas, presentando correlación entre la concentración expuesta y la

concentración encontrada en el cuerpo completo, $R > 0,968$. Por lo tanto, la presencia de Se(IV) en los grupos de almejas expuesta a las especies orgánicas puede indicar que las almejas transformaron parte de las especies orgánicas a Se(IV)

Otras de las especies identificadas en los tejidos durante este estudio ha sido la SeMetSeCys. Esta especie está escasamente documentada en organismos marinos, centrándose la mayoría de los estudios en plantas como el brócoli (Sindelarova *et al.*, 2015). La presencia de esta especie en todos los grupos de almejas indica que las almejas pueden transformar el selenito y la SeMet en SeMetSeCys, siendo del mismo orden de magnitud. En peces, únicamente Schram *et al.* (2008) alimentando bagres africanos (*Clarias gariepinus*) con ajos enriquecidos con selenio, han descrito la presencia de SeMetSeCys en el músculo.

En el grupo de almejas expuestas con SeMetSeCys, se identificó entre el 10% y el 15 % del selenio total como SeMetSeCys, además se registró una buena correlación entre la concentración de SeMetSeCys en el tejido con la concentración expuesta ($R > 0,894$), esto puede indicar que una parte de la SeMetSeCys ingerida por las almejas es estable.

Sin embargo, en los tejidos de las almejas no se detectó la presencia de SeCys. Estos resultados difieren de los encontrados en la bibliografía, donde la mayoría de los estudios de especiación en organismos marinos han descrito la presencia de SeCys (Schram *et al.*, 2008; Pedreo *et al.*, 2011).

Por último, se detectaron especies desconocidas U1, U2, U3, U4, las cuales también han sido detectadas por Mazej *et al.* (2008) en plantas, usando el mismo tipo de separación cromatográfica (intercambio catiónico) y técnica instrumental (AFS). Estas especies desconocidas representan el 93, 86, 52 y 90% con respecto a la concentración de selenio total para almejas expuestas a Se(IV), SeMet, SeMetSeCys y alimentadas con Tiso enriquecida con selenio, respectivamente.

En la bibliografía no se ha encontrado hasta la actualidad, estudios de especiación de selenio en separación subcelular, y los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que las especies de selenio en las branquias y hepatopáncreas de las almejas expuestas con selenito y alimentadas con Tiso enriquecida se encuentran entre fracciones biológicamente desactivadas y desechos celulares. Sin embargo, en el hepatopáncreas de las almejas

expuestas a SeMet, el 100, 25 y 4 % de la especie descoconocida U4, SeMet y Se(IV) respectivamente se encuentra en las fracciones biológicamente activas. En el caso de las branquias y hepatopáncreas de almejas expuestas al SeMetSeC ys, la especie desconocida U4 se encuentra en la fracción biológicamente activa. Por lo tanto, la especie desconocida U4 al encontrarse en la fracción biológicamente activa, es la especie más biodisponible seguido por SeMet y en menor proporción Se(IV) (Wallace y Luoma, 2003)

Capítulo 6.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La supervivencia de las almejas fue afectada por la concentración y especie de selenio a la que se expusieron, obteniéndose un 100% mortalidad a los 28, 7 y 21 días de exposición con $1000 \mu\text{g Se L}^{-1}$, $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ y $25 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, SeMet y SeMetSeCys, respectivamente. Sin embargo, la mortalidad para los grupos de almejas alimentadas con microalgas enriquecidas con selenio fue del 35%.
2. La tasa de aclaramiento varió en los grupos de almejas expuestos a concentraciones más altas de Se(IV), SeMet y SeMetSeCys con respecto al control. Sin embargo no afecta al grupo de almejas alimentadas con Se-Tiso.
3. La actividad enzimática Se-GPx fue el principal mecanismo para combatir el estrés oxidativo derivado de la exposición a dosis elevadas de selenio en *R. decussatus*
4. El contenido de selenio en el cuerpo de las almejas y de los distintos tejidos (manto, pie, vísceras, branquias y hepatopáncreas) de las almejas se ajustó a modelos cinéticos de primer orden, para todas las concentraciones y especies de selenio estudiadas.
5. Los factores de bioconcentración (BCFs) incrementaron en el siguiente orden: Se(IV) < SeMetSeCys < SeMet. La relación K_d/K_u fue mayor a 1 para las almejas expuestas a selenito, y menor a 1 para las almejas expuestas a especies orgánicas, indicando que *R. decussatus* regula de forma diferente el selenio dependiendo de la especie a la que esté expuesta.
6. Para las almejas alimentadas con Se-Tiso, la AE, IR, K_e fueron entre 68-78%; 0,70-0,74 $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$; 0,031-0,129 d^{-1} , respectivamente para todas las concentraciones de selenio estudiadas. Los factores de transferencia trófica se encontraron en el rango entre 3,75 y 16,5, indicando biomagnificación.
7. La distribución de selenio en los distintos tejidos incrementó en el siguiente orden: pie = manto < vísceras < branquias < hepatopáncreas
8. En la separación subcelular, un rango entre el 35 y 81 % del contenido de Se total de las branquias y hepatopáncreas se encontró en las fracciones biológicamente

- detoxificadas, mientras que menos del 28 % del selenio se encontró en la fracción biológicamente activa. La biodisponibilidad trófica del selenio (TAM) fue entre 70-80% y 50-53% en hepatopáncreas y branquias.
9. El contenido de selenio en las almejas expuestas a $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de selenito, $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, $5 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMetSeCys y $4,37 \mu\text{g Se Kg}^{-1}$ de Se-Tiso se ajustó a modelos cinéticos de uno y dos compartimentos. La eficiencia de retención de *R. decussatus* se situó entre 9 y 24% del Se inicial al final de la etapa de depuración para todos los tratamientos.
 10. Para el compartimento a corto plazo, la vida media biológica de selenio se encontró entre 1 y 3 días en el cuerpo completo de las almejas de los distintos tratamientos estudiados en este trabajo, excepto para las almejas expuestas a $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de SeMet, que fue 10 días. Para los tejidos, la vida media biológica de selenio se encontró entre el 1 y 6 días.
 11. Para el compartimento a largo plazo, la vida media biológica de selenio se encontró entre 23 y 46 días para las almejas expuestas a especies de selenio orgánicas y alimentadas con Se-Tiso. Para tejidos, la vida media biológica es mayor de 60 días, y distinta dependiendo del tejido y la especie de selenio utilizada en la exposición.
 12. En especiación se detectó la presencia de tres especies conocidas de selenio (Se(IV), SeMet, SeMetSeCys) y 4 especies desconocidas (U1, U2, U3,U4) en el cuerpo completo, tejidos y fracciones subcelulares.
 13. El porcentaje de especies conocidas se halló en el rango entre 4-16, 7-27, 31-66 y 6-29 % en las almejas expuestas a selenito, SeMet, SeMetSeCys y alimentadas con Se-Tiso, respectivamente.
 14. SeMetSeCys fue detectada en todos los grupos de almejas; Se(IV) en los grupos de almejas expuestas a Se(IV), SeMet y SeMetSeCys; y solamente se detectó SeMet en el grupo almejas expuestas a SeMet.
 15. En la separación subcelular, las especies de selenio detectadas se encuentran en las fracciones biológicamente detoxificadas en almejas expuestas a selenito y alimentada con Se-Tiso. Sin embargo, el 25% de SeMet en almejas expuestas a

SeMet y la especie desconocida U4 en almejas expuestas a SeMet y SeMetSeCys se encuentra en la fracción biológicamente activa.

Capítulo 7.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam-Guillermin, C.; Fournier, E.; Floriani, M.; Camilleri, V.; Massabuau, J.C. and Garnier-Laplace, J. 2009. Biodynamics, subcellular partitioning, and ultrastructural effects of organic selenium in a freshwater bivalve. *Environmental Science y Technology*, 43 (6): 2112-2117. DOI: 10.1021/es802891j
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). 2011. *Evaluación Nutricional de la Dieta Española (II)*. Micronutrientes. Sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. Toxicological profile for Selenium. Atlanta (GA). U.S. Public Health Service. Department of Health and Human Services. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=153&tid=28>
- Aggett, P.; G.F. Nordberg; M. Nordberg. 2015. Essential metals: assessing risks from deficiency and toxicity. En: G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (4th edition). San Diego: Academic Press. Volumen 1, Chapter 14, pp. 281–297. ISBN 9780444594532.
- Aguilar, F. *et al.*, 2009. EFSA-Q-2005-170, EFSA-Q-2006-306, EFSA-Q-2006-308 Semethyl-L-selenocysteine added as a source of selenium for nutritional purposes to food supplements. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food Adopted on 28 Apr. *EFSA Journal*, 1067, pp.1–23. DOI: 10.2903/j.efsa.2009.1067
- Ahn, I.-Y., Woong Cho, K., Choi, K.-S., Seo, Y. y Shin, J. 2000. Lipid content and composition of the Antarctic lamellibranch, *Laternula elliptica* (King & Broderip) (Anomalodesmata: Laternulidae), in King George Island during an austral summer. *Polar Biol.*, 23: 24–33.
- Akesson, B. y Srikumar, T.S., 1994. Occurrence of low-molecular-weight and high molecular-weight selenium compounds in fish. *Food Chemistry* 51, 45–49.
- Akesson, B. y Srikumar, T.S., 1994. Occurrence of low-molecular-weight and high molecular-weight selenium compounds in fish. *Food Chemistry* 51, 45–49.
- Alarcón Corredor, O. M. 2009. Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa -ULA*, 4 (3): 107-124. Disponible: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/31376/1/articulo3.pdf>
- Albert, M., Demesmay, C., Rocca, J.L. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* (1995) 351: 426-432.
- Alexander, J. 2015. Selenium. En: *Handbook on the Toxicology of Metals* (4ª ed.) Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler and Monica Nordberg (Eds). Academic Press, San Diego. Cap.52: 1175-1208. ISBN: 9780444594532
- Allmang, C.; Wurth, L.; Krol, A. 2009. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1790: 1415–1423. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.03.003

- Alquezar, R.; Markich, S.J.; Twining, J.R. 2007. Uptake and loss of dissolved ^{109}Cd and ^{75}Se in estuarine macroinvertebrates. *Chemosphere*, 67: 1202–1210.
- Alsop DK. y Wood CM. 2000. Kinetic analysis of zinc accumulation on the gills of juvenile rainbow trout: Effects of zinc acclimation and implications for biotic ligand modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:1911–1918.
- Altunay, N.; Gürkan, R. 2016. Separation/preconcentration of ultra-trace levels of inorganic Sb and Se from different sample matrices by charge transfer sensitized ion-pairing using ultrasonic-assisted cloud point extraction prior to their speciation and determination by hydride generation AAS. *Talanta*, 159: 344-355. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.054>.
- Amiard-Triquet C, Berthet B, Metayer C, Amiard JC. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. II. Experimental study. *Marine Biology* 1986; 92:7–13
- Amoako, P.O.; Uden, P.C.; Tyson, J.F. 2009. Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. *Analytica Chimica Acta*, 652 (1–2): 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.08.013>
- APROMAR. 2016. La acuicultura en España.
- Aro, A., Alfthan, G., Varo, P. 1995. Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland. *Analyst*, 120:841–843.
- Ávila Torres, J.M.; Beltrán de Miguel, B.; Cuadrado Vives, C.; del Pozo de la Calle, S.; Rodríguez Castilla, M.V. y Ruiz Moreno, E. 2007. *La alimentación española: características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta*. Coord. O, Moreiras Tuny, G. Varela Moreiras. Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid. 632 p.
- Baines, S.B.; N.S. Fisher; M.A. Doblin; G.A. Cutter. 2001. Uptake of dissolved organic selenides by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 46: 1936-1944. DOI: 10.4319/lo.2001.46.8.1936
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., Scott, G.I., 2007. In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, 259–267
- Baqueiro, C. E., Aldana-Aranda, D. Sevilla, M. L. y Rodríguez-Espinosa, P. F.. 2007. Variations of gametogenic and spawning patterns of the oyster *Crassostrea virginica* from Pueblo Viejo Lagoon, Veracruz, Mexico. *Transitional Waters Bulletin. Bivalvia* (on-line), Animal Diversity Web. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Bivalvia.html>
- Baqueiro-Cárdenas, E. R., Borabe, L., Goldaracena-Islas, C. G., & Rodríguez-Navarro, J. (2007). Los moluscos y la contaminación: Una revisión. *Revista mexicana de biodiversidad*, 78, 1-7.

- Baran, E. J. 1990. La Nueva Farmacoterapia Inorgánica. XI. Algunos Comentarios sobre la Bioquímica y la Farmacología del Selenio. *Acta Farm. Bonaerense*, 9 (3): 175-82. Disponible en: 2009-04-14T03:00:00Z
- Barceloux, D.G.; Barceloux D. 1999. Selenium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 37 (2): 145-172. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1081/CLT-100102417>
- Barnes, R.D., 1984. *Zoología de los Invertebrados* (4^a ed.). Nueva Editorial Interamericana. México, DF.
- Barrington J. W., Taylor M., Smith S., Bowen-Simpkins P. 1997. Selenium and recurrent miscarriage. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 17: 199-200
- Barron, M.G., Stehly, G.R y Hayton, W.L. 1990. Pharmacokinetic modeling in aquatic animals I. Models and concepts. *Aquatic Toxicology*, 18: 61-86
- Bassil, J; Naveau, A.; Bodin, J.; Fontaine, C.; Di Tullo, P.; Razack, M.; Kazpard, V. 2014. The nature of selenium species in the hydrogeological experimental site of Poitiers. *Procedia Earth and Planetary Science*, 10, 159-163 DOI: 10.1016/j.proeps.2014.08.050
- Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.D.R., Widdows J. 1985. *The effects of stress and pollution on marine animals*. Praeger: New York.
- Bebianno M.J, Nott J.A, Langston W.J. 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology* 27:315–334.
- Bebianno M.J, Serafim M.A, Rita M.F. 1994. Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussata*. *Bull Environ Contam Toxic* 53:726–732.
- Bebianno M.J, Serafim M.A, Simes D. 2000. Metallothioneins in the clam *Ruditapes decussatus*: an overview. *Analisis*, 28 (5): 386–390. <http://dx.doi.org/10.1051/analisis:2000280386>
- Bebianno M.J. y Serafim M.A. 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of bivalves molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Science of the Total Environment* 214: 123–131. [http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00059-X](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00059-X).
- Bebianno, M.J. y Barreira, L., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ría Formosa lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1849-1860.
- Bebianno, M.J., G ret, F., Hoarau, P., Serafim, M.A., Coelho, M.R., Gnassia e Barelli, M., Rom o, M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Review Biomarkers*, 9 (4, 5): 305-330.

- Bebianno, M.J.; Serafim, M.A. 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 53–66. DOI: 10.1007/s00244-002-2004-7.
- Behne D.; Kyriakopolis A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annual Review of Nutrition* 21:453-473. DOI: 10.1146/annurev.nutr.21.1.453.
- Bhattacharya, B.; Sarkar, S.K.; Das, R. 2003. Seasonal variations and inherent variability of selenium in marine biota of a tropical wetland ecosystem: implications for bioindicator species. *Ecological Indicators*, 2 (4): 367-375. [http://doi.org/10.1016/S1470-160X\(03\)00006-2](http://doi.org/10.1016/S1470-160X(03)00006-2).
- Blackmore, G. y Wang, W-X. 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se, and Zn accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at different salinities. *Aquatic Toxicology*, 62 (3): 205-218. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00083-8).
- Blasco, J. y Puppo, J. 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanina aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 122: 253–263
- Bodnar, M.; Konieczka, P.; Namiesnik, J. 2012. The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 30:225–252. DOI: 10.1080/10590501.2012.705164
- Bonneris, E., Perceval, O., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. *Environmental Pollution*, 135 (2): 195–208
- Bonneris, E.; Giguère, A.; Perceval, O.; Buronfosse, T.; Masson, S.; Hare, L.; Campbell, P. G.C. 2005. Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology*, 71: 319–334
- Borgmann, U., Norwood, W.P., 1995. Kinetics of excess (above background) copper and zinc in *Hyalella azteca* and their relationship to chronic toxicity. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 52: 864–874.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., Clarke, C., 1993. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. *Hydrobiologia* 259: 79–89.
- Breynaert, E.; C. Bruggerman; A. Maes. 2008. XANES-EXAFS analysis of Se solid-phase reaction products formed upon contacting Se(IV) with FeS₂ and FeS. *Environmental Science and Technology*, 42: 3595-3601. DOI: 10.1021/es071370r
- Brown, DA y Parsons, TR. 1978. Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to

- mercury in a controlled ecosystem. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35:880–884,
- Bryszewska, M.A. y Mage, A. 2015. Determination of selenium and its compounds in marine organisms. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 29: 91–98.
- Bryszewska, M.A. y Måge, A. 2015. Determination of selenium and its compounds in marine organisms. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29: 91-98. <http://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.10.004>
- Cabral de Lima, G.; Campos do Lago, A.; Alves Chaves, A.; Sergio Fadini, P.; Orival Luccas, P. 2013. Determination of selenium using atomically imprinted polymer (AIP) and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 768: 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.051>.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). 2009. *Canadian Soil Quality Guidelines: Selenium*. Environmental and Human Health Supporting Document [Internet]. Winnipeg (MB): Canadian Council of Ministers of the Environment. 103 pp. Report No.: PN 1438. Disponible en: http://www.ccme.ca/assets/pdf/soqg_se_scd_1438.pdf
- Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filipelli M, Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissue. *Aquatic Toxicology*, 46: 67-76.
- CAPDER (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural). 2016. Producción de acuicultura marina y valoración en Andalucía. Año 2014. En: *Producción Andalucía. Anuario 2014*. 9º Parte. Pesca. Junta de Andalucía. http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Anuario%202014_2.zip
- Capelo, J.L.; P. Ximenez, Y. Madrid, C. Camara. 2004. Enzymatic probe sonication (Eps): enhancement of protease-catalysed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. *Analytical Chemistry*. 76: 233-237.
- Carvalho, D. C.; Coelho, L. M.; Acevedo, M. S. M.S.F.; Coelho, N. M.M. 2015. The oligoelements. En: *Handbook of Mineral Elements in Food*. Eds. M. de la Guardia and S. Garrigues. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. Chapter 5: 109–122. DOI: 10.1002/9781118654316.ch5
- Chandurvelan, R.; Marsden, I.D.; Gaw, S.; Glover, C.N. 2012. Impairment of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) physiology by waterborne cadmium: Relationship to tissue bioaccumulation and effect of exposure duration. *Aquatic Toxicology*, 124-125: 114-124. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.013>
- Chapman PM; Adams WJ; Brooks ML; Delos CG; Luoma SN; Maher WA; Ohlendorf HM; Presser TS; Shaw DP. (Eds.). 2009. *Ecological assessment of selenium in the aquatic environment: Summary of a SETAC Pellston Workshop*. Pensacola FL (USA): Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). 36 pp. https://wwwrcamnl.wr.usgs.gov/Selenium/Library_articles/pellston_SELSummary.pdf

- Chapman PM; Adams WJ; Brooks ML; Delos CG; Luoma SN; Maher WA; Ohlendorf HM; Presser TS; Shaw DP. (Eds.). 2010. *Ecological assessment of selenium in the aquatic environment*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). New York: CRC Press. 368 pp. ISBN: 978-1-4398-2677-5
- Chatziargyriou, V. y Dailianis, S. 2010. The role of selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) against oxidative and genotoxic effects of mercury in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). *Toxicology in vitro*, 24: 1363–1372
- Chen YW, Truong HYT, Belzile N. 2008. Abiotic formation of elemental selenium and role of iron oxides surfaces. *Chemosphere*, 74:1079-1084.
- Chen, C.L. y Whanger, P.D., 1994. Interaction of selenium and arsenic with metallothionein: effect of vitamin B12. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 54 (4): 267–276.
- Cheung M S, Wang W X. 2005. Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. *Marine Ecology Progress Series*, 286: 155–166
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guigonis, J.-M., Samson, M., Roméo, M., Bebianno, M.J., 2009. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology*, 94, 300–308
- Christophersen, O.A., Lyons, G., Haug, A., Steinnes, E. 2013. Selenium. In: Chapter 16. Alloway BJ (ed) *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*, 3rd edn. Springer Science + Business Media, Dordrecht, pp 429–463
- Combs, G.F. 2001. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85: 517-857.
- Conover RJ (1966) Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 11:338–354
- Coughlan, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearing of suspension. *Marine Biology*, 2: 356-358
- Cravo, C.; C. Pereira,T.; Gomes,C.; Cardoso, A.; Serafim, C.; Almeida, T.; Rocha, B.; Lopes, R.; Company, A.; Medeiros, R.; Norberto, R.; Pereira, O.; Araújo, M. y Bebianno, J. 2012. A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal. *Marine Environmental Research*, 75: 23–34. doi:10.1016/j.marenvres.2011.09.012
- Cunha I, Mangas-Ramirez E, Guilhermino L. 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 145C: 648-657.

- Cunningham, PA. 1979. The use of bivalve molluscs in heavy metal pollution research. In: *Marine Pollution: Functional Responses*. Vernberg WB, Calabrese A, Thurberg FP, Vernberg FJ (eds). New York: Academic Press. 183–221 pp.
- Cupp-Sutton K.A. and Ashby M.T. 2016. Biological chemistry of hydrogen selenide. *Antioxidants*, 5: 42
- Cutter, G. A. and Bruland, K. W. 1984. The Marine Biogeochemistry of Selenium: A Re-Evaluation, *Limnol. Oceanogr.*, 29, 1179–1192.
- Cutter, G.A. 1989. The estuarine behavior of selenium in San Francisco Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 28: 13-34.
- Cutter, G.A. and L.S. Cutter. 1995. Behavior of dissolved antimony, arsenic, and selenium in the Atlantic Ocean. *Mar. Chem.*, 49: 295-306
- DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentrations. *Aquatic Toxicology* 84:236–246.
- Dernovics, M.; Z. Stefanka, P. Fodor, 2002. Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched. *Anal. Bioanal. Chem.* 372: 473.
- Díaz, X., W.P. Johnson, W.A. Oliver, and D.L. Naftz. 2009. Volatile selenium flux from the Great Salt Lake. *Environmental Science and Technology*, 43: 53-59.
- Doblin, M.A., S.B. Barnes, L.S. Cutter and G.A. Cutter. 2006. Selenium biogeochemistry in the San Francisco Bay estuary: Seston and phytoplankton. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67: 681-694.
- Dolgova, N.V; Hackett, M. J.; MacDonald, T.C.; Nehzati, S; James, A.K.; Krone, P.H.; George, G.N. and Pickering I.J. 2016. Distribution of selenium in zebrafish larvae after exposure to organic and inorganic selenium forms. *Metallomics*, 8: 305-312. DOI: 10.1039/c5mt00279f
- Dolgova, N.V; Hackett, M. J.; MacDonald, T.C.; Nehzati, S; James, A.K.; Krone, P.H.; George, G.N. and Pickering I.J. 2016. Distribution of selenium in zebrafish larvae after exposure to organic and inorganic selenium forms. *Metallomics*, 8: 305-312. DOI: 10.1039/c5mt00279f
- DOUE, Directiva 2015/1787/UE de la Comisión, de 6 de octubre de 2015, por la que se modifican los anexos II y III de la Directiva 98/83/CE del Consejo, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (*DOUE L*, núm. 260, 7-10-2015, pág. 6-17).
- Downs K. M., Hess J. B. & Bilgili S. F. (2000). Selenium source effect on broiler carcass characteristics, meat quality and drip loss. *Journal of Applied Animal Research*, 18: 61-71.

- Dubois, M, y Hare, L. 2009. Selenium assimilation and loss by an insect predator and its relationship to Se subcellular partitioning in two prey types. *Environmental Pollution*, 157: 772–777.
- Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R (2006) Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385 (7): 1304–1323. DOI: 10.1007/s00216-006-0529-8
- El Nemr, A.; Khaled,A.; Moneer, A.A.; El Sikaily, A. 2012. Risk probability due to heavy metals in bivalve from Egyptian Mediterranean coast. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38, (2): 67-75, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.11.001>
- El-Bayoumy, K., 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutation Research*, 475: 123–139.
- Elder, A.; Nordberg, G.F. y Kleinman, M. 2015. Routes of exposure, dose, and toxicokinetics of metals. En: G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg (Eds.) *Handbook on the Toxicology of Metals* (4th edition). San Diego: Academic Press. Vol. 1, Chapter 3, pp. 45–74. ISBN 9780444594532.
- Elguera, J.C.T.; Barrientos, E.Y.; Wrobel, K.; Wrobel, K. 2013. Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 431-441. doi:10.1007/s11738-012-1086-8
- Environment Canada and Health Canada. (2015). *Draft Screening Assessment Selenium and its compounds*. Environment Canada, Health Canada, Ottawa (ON) (Acceso 14 de febrero d 2017) https://www.ec.gc.ca/ese-ees/301B5115-F8B7-430D-8EFA-290903B5FAD1/DSAR_Grouping_Selenium_EN.pdf
- European Food safety Authority (EFSA). 2006. *Annual Report*. EFSA, 76 pp. ISBN: 978-92-9199-052-8
- European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (EFSA NDA Panel). 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* 12(10): 3846. 67 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3846
- EVM (Expert Group on Vitamins and Minerals). 2003. *Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals*. Food Standards Agency Publications, London. 360 pp. ISBN 1-904026-11-7
- Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Rachel Hurst. Selenium in human health and disease. 2011. *Antioxidants & Redox Signaling*; 14: 1337-83. DOI: 10.1089/ars.2010.3275
- Falfushynska, H.I.; Gnatyshyna, L. L; Stoliar, O B. 2013. Effect of in situ exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Unionidae) to trace metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89: 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.024>

- Fan, T.W.M., Teh, S.J., Hinton, D.E., Higashi, R.M., 2002. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology* 57, 65–84).
- Fan, T.W.-M.; Teh, S.J.; Hinton, D.E.; Higashi, R. M. 2002. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology*, 57: 65–84.
- Fan, Y.; Xu, S.; Zhang, H. *et al.* 2014. Selenium supplementation for autoimmune thyroiditis: a systematic review and meta-analysis, *International Journal of Endocrinology*, 2014, 8 pp. doi:10.1155/2014/904573
- FAO, 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme *Ruditapes decussatus*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. Texto de Figueras, A. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. Actualizado 13 January 2005 http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_decussatus/es#tcNA00B1
- FAO, 2015. *Informe de Pesca y Acuicultura*, n° 1131, Roma
- FAO, 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Food and agriculture organization of the United Nations, Roma. 200 pp.
- Farías, A. 2001. Capítulo 5. Nutrición en moluscos pectínidos. En: *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. A.N. Maeda-Martínez (Ed.). Editorial Limusa, SA de CV México City, México, pp. 89–104.
- Farías, A. 2008. Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Taller Técnico Regional de la FAO. A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 297–308.
- Fernandes, A.P.; Gandín, V. 2015. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850 (8): 1642-1660. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.008>
- Fernández-Bañares F, Cabré E, Esteve M, Mingorance MD, Abad-Lacruz A, Lachica M *et al.* 2002. Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status. *American Journal Gastroenterology*, 97: 2103-8.
- Figueira E, Cardoso P, Freitas R. 2012. *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium: toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Comp Biochem Physiol C*, 156:80–86
- Figueira, E. y Freitas, R. 2013. Consumption of *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*: comparison of element accumulation and health risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (8): 5682-5691. doi: 10.1007/s11356-013-1587-z.

- Fishbein L. 1983. Environmental selenium and its significance. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:411-419.
- Fisher, N.S. and J.R. Reinfelder. 1991. Assimilation of selenium in the marine copepod *Acartia tonsa* studied with a radiotracer ratio method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 70(2): 157-164.
- Flynn, A, Hirvonen T, Mensink, G.B.M., Ocké M.C., Serra-Majem, L., Stos, K, Szponer, L., Tetens, I. Turrini, A., Fletcher R. and Wildemann, T. 2009. Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries, *Food Nutr Res*, 18 (53): 103402 51
- Forrest, A.; Kingsley, R.; Schilling, J.-G. 2009. Determination of selenium and tellurium in basalt rock reference materials by isotope dilution hydride generation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ID-HG-ICP-MS). *Geostandards and Geoanalytical Research*, 33: 261–269.
- Foster-Smith, R.L. 1975. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 17 (1): 1-22. [http://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90075-1](http://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90075-1)
- Fournier E, Adam C, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2005 a. Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: Influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species. *Aquat Toxicol* 72:251–260.
- Fournier E, Adam C, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2005 b. Effect of selenium exposure on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* *Radioprotection*, Suppl. 1, vol. 40 (2005) S3-S9
- Fournier, E.; Adam C, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2006. Selenium bioaccumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and subsequent transfer to *Corbicula fluminea*: role of selenium speciation and bivalve ventilation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (10): 2692–2699.
- Frankenberger, W. T. and Engberg, R. A. 1998. *Environmental Chemistry of Selenium*. Ed. CRC Press.
- Freitas, R, Pinto, L.R, Sampaio, M.; Costa S; Silva, M; Rodrigues, AM; Quintino, V; Figueira, E. 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar Coast Shelf S* 10:43–53.
- Freitas, R., Martins, R., Antunes, S., Velez, C., Moreira, A., Cardoso, P., Pires, A., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., 2014. *Venerupis decussata* under environmentally relevant lead concentrations: bioconcentration, tolerance, and biochemical alterations. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 33, 2786e2794. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2740>
- Freitas, R., Martins, R., Antunes, S., Velez, C., Moreira, A., Cardoso, P., Pires, A., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., 2014. *Venerupis decussata* under environmentally relevant

- lead concentrations: bioconcentration, tolerance, and biochemical alterations. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 33, 2786e2794. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2740>
- Freites, L., Labarta, U. y Fernández-Reiriz, M.J. 2002. Evolution of fatty acid profiles of subtidal and rocky shore mussel seed (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk.). Influence of environmental parameters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (268): 185–204.
- Gammelgaard, B.; Jackson, M. I.; Gabel-Jensen, C. 2011. Surveying selenium speciation from soil to cell-forms and transformations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399: 1743-1763.
- Gaspar, M., Carvalho, S., Vasconcelos, P. 2012. Clam fisheries worldwide: main species, harvesting methods and fishing impacts. En: *Clam fisheries and aquaculture*. Costa González, F. da (Ed.) Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 291-327. ISBN: 978-1-62257-518-3.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Response of antioxidant systems to cooper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.* 54,413–417.
- Gissi F.; Stauber JL; Binet MT; *et al.* 2016. A review of nickel toxicity to marine and estuarine tropical biota with particular reference to the South East Asian and Melanesian region. *Environ Pollut* 218:13081323. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.089
- Godin, S.; Fontagné-Dicharry, S.; Bueno, M.; Tacon, P.; Prabhu, P.A.J.; Kaushik, S.; Médale, F.; Bouyssiére, B. 2015. Influence of dietary selenium species on selenoamino acid levels in rainbow trout. *J. Agric. Food Chem.*, 63: 6484–6492.
- Gofas, S. (2014). *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). In: *MolluscaBase* (2017). Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=231749> on 2017-05-17 Gomez-Ariza, J.L.; M.A. Caro de la Torre, I. Giraldez, E. Morales, *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 305.
- Gomez-Ariza, J.L.; Caro de la Torre, M.A. Giraldez, I. Morales. E. 2004 Speciation analysis of selenium compounds in yeasts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography–microwave-assisted digestion–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 524: 305
- Gosling, E., 2002. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Fishing News Books. Blackwell Publishing, UK: 443 pp.
- Gouda, P. 2012. *Arsenic, Selenium, Antimony Ultra-Trace Analysis*. Ed. iUniverse, Inc. Bloomington.
- Guadayol, M.; Cortina, M.; Guadayol, J.M.; Caixach, J. 2016. Determination of dimethyl selenide and dimethyl sulphide compounds causing off-flavours in bottled mineral waters. *Water Research*, 92: 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.016>

- Guillard, R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, p. 29-60. In: *Culture of Marine Invertebrates*. P.B. Smith (ed) Plenum Press, New York.
- Haberhauer-Troyer C., Álvarez-Llamas G., Zitting E., Rodríguez-González P., Rosenberg E., Sanz-Medel A. 2003. Comparison of different chloroformates for the derivatisation of seleno amino acids for gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1015 (1-2): 1-10.
- Hamza-Chaffai, A.; Amiard, J.C.; Pellerin, J.; Joux, L.; Berthet, B. 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127: 185–197. DOI: 10.1016/S0742-8413(00)00147-X.
- Harada, T. and Takahashi, Y. 2009. Origin of the difference in the distribution behavior of tellurium and selenium in a soil-water system. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 72(5):1281-1294.
- Hart D. J., Fairweather-Tait S. J., Broadley M. R., Dickinson S. J., Foot I., Knott P., McGrath S. P., Mowat H., Norman K., Scott P. R., Stroud J. L., Tucker M., White P. J., Zhao F. J. & Hurst R. 2011. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*, 126: 1771-1778.
- He, M. y Wang, W.-X. 2013. Bioaccessibility of 12 trace elements in marine molluscs, *Food and Chemical Toxicology*, 55: 627–636.
- Hédouin L, Metian M, Lacoue-Labarthe T. *et al* 2010. Influence of food on the assimilation of selected metals in tropical bivalves from the New Caledonia lagoon: qualitative and quantitative aspects. *Mar Pollut Bull* 61:568–575
- Hédouin, L.; Metian, M.; Teyssié, JL.; Fichez, R.; Warnau, M. 2017. High contribution of the particulate uptake pathway to metal bioaccumulation in the tropical marine clam *Gafrarium pectinatum*. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-017-8562-z
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. (comp./ed.) 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 2006. 184 pp.
- Henry, M.; Huang, G.; Cornet, C.; Belluau, M.; Durbec, J.P. 1984. Contamination accidentelle par le cadmium d'un mollusque *Ruditapes decussatus*: bioaccumulation et toxicité (CL50, 96H). *Oceanologica Acta* 7 (3): 329-335.
- Henry, M.; Huang, G.; Cristiani, C.; Belluau, M.; Durbec, J.P. 1982. Toxicité et bioaccumulation du cadmium chez la palourde *Ruditapes decussatus*, en fonction des facteurs temps, concentration et température; Vies Journées d'Études Pollution Marines en Méditerranée, Cannes: XVIII CIESM, pp 737-742
- Hermanutz, R. O., Allen, K. N., Roush, T. H. and Hedtke, S. F. 1992. Effects of elevated selenium concentrations on bluegills (*Lepomis macrochirus*) in outdoor

- experimental streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 217–224. doi: 10.1002/etc. 5620110211
- Hernández-Mendoza, H., M. J. Rios-Lugo. 2009. Rol biológico del selenio en el humano. *Química Viva*, Vol. 8 (2): 64-79. Univ. Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina)
- Hesketh J. 2008. Nutrigenomics and selenium: Gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annual Review of Nutrition* 28:157-177.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., y Anderson, M. (2006). Fisiología Animal. Editorial Médica Panamericana.
- Hlavay J., Prohaska T., Weisz M., Wenzel W.W. y Stingeder G.J. (2004). Determination of trace elements bound to soil and sediment fractions. *Pure and Applied Chemistry*, 76 (2): 415–442. <https://doi.org/10.1351/pac200476020415>
- Holm, J., Palace, V., Siwik, P., Sterling, G., Evans, R., Baron, C., Werner, J., Wautier, K., 2005. Developmental effects of bioaccumulated selenium in eggs and larvae of two salmonid species. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2373–2381;
- Howe PL, Reichelt-Brushett AJ, ClarkMW (2014) Effects of Cd, Co, Cu, Ni and Zn on asexual reproduction and early development of the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Ecotoxicology*, 23:1593–1606. doi:10.1007/s10646-014-1299-2
- ICTIOTERM. Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de la costa de Andalucía. Ministerio de Economía y Competitividad, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN). www.ictioterm.es.
- Institute of Medicine (IOM). 2000. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. A Report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and Interpretation and Uses of DRIs, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institut of Medicine. Washington, DC: The National Academies Press. ISBN 978-0-309-06949-6
- Institute of Medicine (IOM). 2006. *Dietary Reference Intakes: The essential guide to nutrient requirements*. Eds. Otten JJ; Hellwig JP; Meyers LD. Washington, DC: The National Academies Press. ISBN 978-0-309-10091-5. doi:<https://doi.org/10.17226/11767>.
- Ipolyi, I., Stefánka, Z., Fodor, P. 2001. Speciation of Se(IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography–direct hydride generation–atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 435: 367-375.
- Ismail, A. (2006). The use of intertidal molluscs in the monitoring of heavy metals and organotin compounds in the west coast of Peninsular Malaysia. *Coastal marine science* 30:401-406

- Jagtap, R.; Maher, W. 2015 Determination of selenium species in biota by HPLC-ICP-MS *Microchemical Journal* 124 · DOI: 10.1016/j.microc.2015.07.014
- Janz, D.M., 2012. Selenium. In: *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), Academic Press, San Diego, pp. 327–374.
- Janz, D.M.; D.K. DeForest; M.L. Brooks; P.M.; G. Gilron; D. Hoff; W.A. Hopkins; D.O. McIntyre; C.A. Mebane; V.P. Palace; J.P. Skorupa; M. Wayland. 2010. Selenium toxicity to aquatic organisms. En: Chapman PM; Adams WJ; Brooks ML; Delos CG; Luoma SN; Maher WA; Ohlendorf HM; Presser TS; Shaw DP. (Eds.). *Ecological assessment of selenium in the aquatic environment*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). New York: CRC Press. Chapter 6. Pages 141–231.
- Jaramillo F, Peng L, Gatlin DM. 2008. Selenium nutrition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. Saxatilis*) bioavailability, toxicity and interaction with vitamin E. *Aquaculture Nutrition*. 15 (2): 160-165.
- Jayasinghe, S.B. y Caruso, J.A. (2011). Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC-ESI-MS methods. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307 (1-3): 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.12.005>
- Jenkins, KD y Mason, AZ. 1988. Relationship between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodenta*. *Aquat Toxicol* 12:229–244;
- Jolley, D. F., Maher, W. A. and Kyd, J. 2004. Selenium accumulation in the cockle *Anadara trapezia*. *Environmental Pollution*, 132: 203 –212
- Juniper DT, Phipps RH, Jones AK, Bertin G. 2006. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effect on selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. *Journal of Dairy Science*, 89: 3544-3551.
- Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, Bertin G. 2009. Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 149: 228-239.
- Kahakachchi C., Boakye H.T., Uden P.C., Tyson J.F. (2004). Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (Indian mustard) and in selenized yeast. *Journal of Chromatography A*, 1054: 303-312. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.083>
- Kannakumarath, S.S.; K. Wrobel, A. Vonderheide, J.A. Caruso, 2002. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 454-460.

- Kastenmayer, P. 1997. Análisis de minerales y elementos traza en alimentos. En: *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Morón, C., Zacarías, I., de Pablo, S. (Eds.). FAO, Santiago (Chile). Capítulo 20, p. 271-294.
- Ke, C. y Wang, W.-X. 2001. Bioaccumulation of Cd, Se, and Zn in an estuarine oyster (*Crassostrea rivularis*) and a coastal oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquatic Toxicology*, 56: 33–51.
- Ke, C.; Wang, W-X. 2001. Bioaccumulation of Cd, Se, and Zn in an estuarine oyster (*Crassostrea rivularis*) and a coastal oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquatic Toxicology* 56 (2001) 33–51
- Ketata, I., Smaoui-Damak, W., Guermazi, F., Rebai, T., Hamza-Chaffai, A., 2007. In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 415–430.
- Kieliszek, M. y Blazejak, S. 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29 (5): 713 - 718
- Kieliszek, M.; Błazejak, S. 2016. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules*, 21(5): 609-624. DOI: 10.3390/molecules21050609
- Klaassen, C. D. 2001. *Toxicology. The basic science of poisons*. 6th Ed. McGraw- Hill, USA
- Kleinow K. M. and Brooks A. S. 1986 a. Selenium compounds in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)--I. Uptake distribution and elimination of orally administered selenate selenite and L-selenomethionine. *Comp. Biochem. Physiol.* 83C, 61-69.
- Kleinow K. M. and Brooks A. S. 1986 b. Selenium compounds in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)--II. Quantitative approach to gastrointestinal absorption, routes of elimination and influence of dietary pretreatment. *Comp. Biochem. Physiol.* 83C, 71 76.
- Klerks, PL y Bartholomew, PR. 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquatic Toxicology*, 19: 97–112.
- Kowalczyk-Pecka, D.; Pecka, S.; Kowalczuk-Vasilev, E. 2017. Changes in fatty acid metabolism induced by varied micro-supplementation with zinc in snails *Helix pomatia* (Gastropoda Pulmonata). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138: 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.033>.
- Kryukov, G.V. and Gladyshev, V.N. 2004. The prokaryotic selenoproteome. *EMBO Rep.* 5 (5): 538–543.

- Kryukov, G.V.; Castellano, S.; Novoselov, S.V.; Lobanov, A.V.; Zehtab, O.; Guigó, R.; Gladyshev, V.N. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300, 1439–1443.
- Küçükbay FZ, Yazlak H, Karaca I, Sahin N, Tuzcu M, Cakmak Mn, Sahin K. 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition*, 15 (6): 569–576.
- Larsen E.H., Hansen M., Fan T., Vahl M. 2001. Speciation of selenoaminoacids, selenonium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae. *Journal of Analytical. Atomic. Spectrometry*, 16: 1403-1408.
- Larsen, E.H.; J. Sloth, M. Hansen, S. Moesgaard. 2003. Selenium speciation and isotope composition in ⁷⁷Se-enriched yeast using gradient elution HPLC separation and ICP-dynamic reaction cell-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 18: 310-316. DOI: 10.1039/B209586F
- Lee, B.-G.; Lee, J.-S.; Luoma, S. N. 2006. Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: a bioenergetic modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (7), pp. 1933–1940.
- Lee, B.-G; Lee, J.-S.; Luoma, S.M. 2006. Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: A bioenergetic modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (7): 1933–1940.
- Lee, D. S., Garland, J. A., Fox, A. A. 1994. Atmospheric concentrations of trace elements in urban areas of the United Kingdom. *Atmospheric Environment*, Volume 28, Issue 16, p. 2691-2713.
- Liu, J., Zhang, K., Ren, X., Luo, G., Shen, J., 2004. Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity. *Analytica Chimica Acta*, 504: 185–189.
- Liu, X. and Wang, W.-X. (2016), Antioxidant and detoxification responses of oysters *Crassostrea hongkongensis* in a multimetal-contaminated estuary. *Environ Toxicol Chem*, 35: 2798–2805. doi:10.1002/etc.3455
- Lopez Heras, I., Palomo, M. & Madrid, Y. 2011. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(6), pp.1717–1727.
- López-Bellido, G, FJ y López, L. 2013. Selenio y salud: valores de referencia y situación actual de la población española. *Nutrición Hospitalaria* [online], 28 (5). pp.1396-1406. ISSN 1699-5198. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.5.6634>
- Lu, Y.; Rumble, A.; Francesconi, K.A.; Pergantis, S.A. 2012. Quantitative selenium speciation in human urine by using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 731: 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.016>

- Lucu, C. y Obersnel, V. 1996. Cadmium influx across isolated *Carcinus* gill epithelium: interaction of lanthanum and calcium with cadmium influxes. *J Comp Physiol B*, 166: 184–189
- Luoma S.N., Johns, C.; Fisher, N.S. Nlsan; Steinberg, A.; Oremland, R.S. Reinfelder, J. R. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 485-491;
- Luoma, S. N., and. Rainbow P. S. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology*,. 39: 1921–1931, doi:10.1021/es048947e
- Luoma, S.N. and T.S. Presser. 2009. Emerging opportunities in management of selenium contamination. *Environmental Science and Technology*, 43:.8483-8487.
- Luoma, S.N., C. Johns, N.S. Fisher, N.A. Steinberg, R.S. Oremland and J.R. Reinfelder. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ. Sci. Technol.*, 26(3): 485-491.
- Luten, J.B.; W. Bouquet, M. Burgraff, J. Rus, P. Bratter, P. Schramel (Eds.), *Trace Element: Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, de Gruyter, NewYork, 1987
- MAGRAMA y ANFACO-CECOPECA. 2012. *Guía de las cualidades nutricionales de los productos procedentes de la pesca extractiva y de la acuicultura: Binomio riesgo-beneficio*. Ed. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Secretaría General Técnica, Centro de publicaciones. Madrid. 60 p
- Maher, W., A. Roach, M. Doblin, T. Fan, S. Foster, R. Garrett, G. Möller, L. Oram, and D. Wallschläger. 2010. Environmental sources, speciation, and partitioning of selenium. En: Chapman PM; Adams WJ; Brooks ML; Delos CG; Luoma SN; Maher WA; Ohlendorf HM; Presser TS; Shaw DP. (Eds.). 2010. Ecological assessment of selenium in the aquatic environment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). New York: CRC Press. Chapter 4. Pages 47–92.
- Manahan DT. 1990. Adaptations by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. *Amer Zool* 30:147–160.
- Maranhão, T. de A; Silva, J.S.A.; Bascuñan; V.L.A.F; Oliveira; F.J.S.; Curtius, A. J. 2011. Analysis of acetic acid extraction solutions by inductively coupled plasma mass spectrometry for the classification of solid waste. *Microchemical Journal*, 98 (1): 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.10.007>.
- Marean, C.W., 2010. Pinnacle Point Cave 13B (Western Cape Province, South Africa) in context: The Cape Floral Kingdom, Shellfish, and Modern Human Origins. *Journal of Human Evolution*, 59 (3-4), 425-443.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392.

- Martens, D. A. 2003. Selenium. En: *Encyclopedia of water science*. Ed. B. A. Stewart y T. A. Howell. Marcel Dekker, Inc. New York. 840-842.
- Martinez-Haro, M.; Pais-Costa, A.J.; Verdelhos, T.; Marques, J.C.; Acevedo, P. 2016. Optimising a clearance index based on neutral red as an indicator of physiological stress for bivalves. *Ecological Indicators*, 71: 514 - 521. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.025>
- Marval-León, J.R.; Cámara-Martos, F.; Pérez-Rodríguez, F.; Amaro-López, M. A.; Moreno-Rojas, R. 2012. Optimization of selenium determination based on the hg-et-aas method for its application to different food matrices. *Food Anal. Methods*, 5: 1054. doi:10.1007/s12161-011-9338-6
- Mayland, H. F.; James, L. F.; Panter, K. E.; Sonderegger, J. L. 1989. Selenium in Seleniferous Environments. In: L. W. Jacobs, editor, *Selenium in Agriculture and the Environment*, SSSA Spec. Publ. 23. SSSA and ASA, Madison, WI. p. 15-50.
- Mayland, H.F. and Gough, L.P. and Stewart, K.C. 1991. *Selenium mobility in soils and its absorption, translocation, and metabolism in plants*. United States Geological Survey (USGS) Circular No. 1064. pp. 55-64.
- Mazej, D.; Osvald, J.; Stibilj, V. 2008. Selenium species in leaves of chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley. *Food Chemistry*, 107: 75–83.
- McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, DeForest D, Brigham SI, Adams WJ, Green A. 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem*, 22: 1017– 1037.
- McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, DeForest D, Brigham SI, Adams WJ, Green A. 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem*, 22: 1017– 1037.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2085–2092.
- Mehdi, Y., Hornick, J.L., Istasse, L., Dufrasne, I. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18, 3292-3311.
- Mellano, F.; Bujalance, M.; Giráldez, I.; Ruiz-Azcona, P.; Sánchez-Rodas, D.; Morales E. 2013. Determination of selenomethionine and seleno-methyl-selenocysteine in biota by ultrasonic-assisted enzymatic digestion and multi-shot stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1300: 151-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.029>
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere*. 93: 2217–2223.

- MERAG. 2007. *Metals Environmental Risk Assessment Guidance*. International Council on Mining and Metals ICCM, London, UK. ISBN: 978-0-9553591-2-5
- Mistry, H.D.; Pipkin, F.B.; Redman, C.W.; Poston, L. 2012. Selenium in reproductive health. *American journal of obstetrics and gynecology* 206 (1): 21–30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.034>
- Montes-Bayon, M.; M.J.D. Molet, E.B. Gonzalez, A. Sanz-Medel. 2006 Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 68: 1287-1293.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C. 2016. *Tablas de composición de alimentos. Guía de prácticas*. Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, SA). 18ª edición revisada y ampliada. 472 p
- Moreno P., Quinano M.A., Gutiérrez A.M., Pérez-Conde M.C., Cámara. 2001. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16: 1044-1050.
- Moreno, MJ, R, Rivero,C, y Ballesta, J, 1998, Contenido de selenio en diferentes plantas en régimen semiárido. *Ecología*, N.12 pp. 113-121.
- Moreno, P.; M.A. Quijano, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara 2004. *Analytical Chemical Acta*, 315
- Mostert, V. 2000. Selenoprotein P: Properties, functions, and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 376: 433–438.
- Muscatello, J.R., Bennett, P.M., Himbeault, K.T., Belknap, A.M., Janz, D.M., 2006. Larval deformities associated with selenium accumulation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to metal mining effluent. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6506–6512;
- Naimo, T.J., 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4, 341–362.
- Narváez N., C. Lodeiros, O. Nucetti, y A. Maeda-Martinez. 2005. Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L.1758) (Mollusca:Bivalvia). *Cienc. Mar.* 31(1A):91-102.
- National Research Council (NCR). 1983. Selenium in Nutrition: Revised Edition. Subcommittee on Selenium, Washington (DC): National Academies Press (US). 2 Chemistry. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216732/>
- Navarro-Alarcon, M. and Cabrera-Vique, C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*, 400, 115–141. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.024
- Neuberger-Cywiak, L., Achituv, Y. & Garcia, E.M. 2007. Effects of Sublethal Zn⁺⁺ and Cd⁺⁺ Concentrations on Filtration Rate, Absorption Efficiency and Scope for

- Growth in *Donax trunculus* (Bivalvia; Donacidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79 (6): 622-627. doi:10.1007/s00128-007-9306-4
- Nordberg, M. y Nordberg, G. F. 2016. Trace element research-historical and future aspects, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38: 46-52.
- Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U. 2002. Chapter 17. Molluscs as bioindicators. En: *Bioindicators & Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*. B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister (eds). Elsevier Science B.V. pp. 577-635. ISSN 1875-1121. [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L. y Abad, M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, (238): 451-468.
- Okazaki, R.K.; Panietz, M.H. 1981. Depuration of twelve trace metals in tissues of the oysters *Crassostrea gigas* and *C. Virginica*. *Marine Biology*, 63: 113-120.
- Önning G. Y Bergdahl I.A. 1999. Separation of soluble selenium compounds in different fish species. *The Analyst*, 124:1435-1438.
- Ortega, R.M., López-Sobaler, A.M., Requejo, A.M., Andrés, P. 2004. *La composición de los alimentos*. Herramienta básica para la valoración nutricional. Ed. Complutense. Madrid.
- Paez-Osuna, F. y Marmolejo-Rivas, C. 1990 Trace metals in tropical coastal lagoon bivalves, *Crassostrea corteziensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45(4): 538-544.
- Paikaray S. 2016. Origin, mobilization and distribution of selenium in a soil/water/air system: a global perspective with special reference to the indian scenario. *Clean Soil Air Water*, 44: 474-487.
- Palace, V.P., Spallholz, J.E., Holm, J., Waultier, K., Evans, R.E., Baron, C.L., 2004. Metabolism of selenomethionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos can generate oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58: 17-21
- Pardeshi, P.B. 2015. A study on biochemical composition in selected tissues of freshwater bivalve *Lamellidens marginalis* from Godavari River at Paithan. *Journal of Basic Sciences*, Special Issue on BioIPPF, 14-19
- Pascoe, PL, Parry HE, Hawkins AJS. 2009. Observations on the measurement and interpretation of clearance rate variations in suspension-feeding bivalve shellfish. *Aquatic Biology*, 6 (1-3): 181-190. doi: 10.3354/ab00123
- Patching SG, Gardiner PH. 1999. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: A review. *J Trace Elem Med Biol* 13:193-214.
- Payne RL, Lavergne TK y Southern LL. 2005. Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration. *Poultry Science*, 84: 232-237.

- Pedrero, Z.; Madrid, Y. 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, 634 (2): 135–152. DOI:10.1016/j.aca.2008.12.026
- Pedrero, Z.; Murillo, S.; Cámara, C.; Schram, E.; Luten, J.B.; Feldmann, I.; Jakubowski, N. y Madrid, Y. 2011. Selenium speciation in different organs of African catfish (*Clarias gariepinus*) enriched through a selenium-enriched garlic based diet. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26: 116-125.
- Pelaez M.W., Bayon M.M., García Alonso, J.I.; Sanz-Medel A. 2000. A comparison of different derivatisation approaches for the determination of selenomethionine by GC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15: 1217-1222. DOI: 10.1039/B000505N
- Peters, T. Jr. 1968. Proposals for standardization of total protein assays. *Clinical Chemistry* 14: 1147-1159.
- Polettini, A-E.; Fortaner, S.; Farina, M.; Groppi, F.; Manenti, S.; Libralato, G.; Sabbioni, E. 2015. Uptake from water, internal distribution and bioaccumulation of selenium in *Scenedesmus obliquus*, *Unio mancus* and *Rattus norvegicus*: Part A. *Bull Environ Contam Toxicol*, 94:84–89. DOI 10.1007/s00128-014-1407-2
- Ponce de Leon C.A., Sutton K.L., Caruso J.A., Uden P.C. 2000. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15: 1103-1107.
- Potet, M.; Devin, S.; Pain-Devin, S.; Rousselle, P.; Giambérini, L. 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution*, 218: 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>.
- Pouil, S.; Bustamante, P.; Warnau, M.; Oberhansli, F.; Teyssi JL; Metian, M. 2015. Delineation of ¹³⁴Cs uptake pathways (seawater and food) in the variegated scallop *Mimachlamys varia*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 148: 74-79 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.06.014>
- Poutiers, J.M. 1987. Bivalves. En: *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. I* (Invertébrés: 371-512). Fischer, W., et al (Eds.). FAO, Rome, Vol. I: iii-xvi + 1 - 760 p.
- Presser T,S. and Luoma S,N, 2006. Forecasting Selenium Discharges to the San Francisco Bay-Delta Estuary: Ecological Effects of a Proposed San Luis Drain Extension. USGS, Science for a changing world, 196 p
- Qiu, P.; Ai, Ch.; Lin, L.; Wu, J.; Ye, F. 2007. Simultaneous determination of selenium and arsenic contents in different extracts of Radix Astragali by enhancement effect of ethanol in hydride generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 87 (1): 1-5, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.04.001>

- Quijano, M. A.; Moreno, P.; Gutiérrez, A. M.; Pérez-Conde, M. C.; Cámara, C. (2000) Selenium speciation in animal tissues after enzymatic digestion by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35: 878–884. doi:10.1002/1096-9888(200007)35:7<878::AID-JMS12>3.0.CO;2-2
- Rainbow P S, Luoma S N, Wang W X. 2011. Trophically available metal: A variable feast. *Environmental Pollution*, 159: 2347–2349
- Rainbow, P.S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120(3), 497-507.
- Ralston NVC, Unrine J, Wallschläger D. 2008. *Biogeochemistry and analysis of selenium and its species*. North American Metals Council, Washington (DC, USA). Selenium Working Group. 58 pp.
- Ranson, G. 1951. *Les huîtres. Biologie. Culture*. Lechevalier (ed), Paris. En: Corral, M L, H Grizel, J Montes, E Polanco. 2000. *La acuicultura*. Biología, Regulación, Fomento, Nuevas Tendencias y Estrategia comercial. Ed. Mundi-Prensa. Madrid
- Rayman, M. P. 2008. Food chain Se and human health: emphasis on intake. University of Surrey, 33 p
- Rayman, M. P. 2012. Selenium and human health. *Lancet*, 379: 1256–1268. doi:10.1016/S0140-6736(11)61452-9
- Rayman, MP. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356: 233-41. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02490-9
- Reinfelder JR, Fisher NS. 1994. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. *Limnol Oceanogr* 39:12–20.
- Reinfelder JR, Wang WX, Luoma SN, Fisher NS. 1997. Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: a comparison of oysters, clams and mussels. *Mar Biol* 129:443–452
- Reinfelder N.S. Fisherb, S.N. Luoma, J.W. Nicholstd, W.-X. Wange. 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. *The Science of the Total Environment*, 219: 117-13
- Reinfelder, J.R.; Wang, W.-X.; Luoma, S.N.; Fisher, N.S. 1997. Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: A comparison of oysters, clams and mussels. *Marine Biology*, 129: 443-452.
- Reinfelder, JR; Fisher, NS; Luoma, SN; Nichols, JW; Wang, WX. 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. *The Science of the Total Environment* 219:117–135
- Roditi HA, Fisher NS. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnol Oceanogr* 44:1730–1749

- Rodríguez-Iruretagoiena, A.; Rementeria, A.; Zaldibar, B.; Fdez-Ortiz de Vallejuelo, S.; Gredilla, A.; Arana, G.; de Diego, A. 2016. Is there a direct relationship between stress biomarkers in oysters and the amount of metals in the sediments where they inhabit? *Marine Pollution Bulletin*, 111 (1–2): 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.025>.
- Roesijadi, G. 1980. The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates: current status. *Mar Environ Res* 4:167–179;
- Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., 1997. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 118, 33–37.
- Royo, A. 1986. *Estudios sobre el cultivo de Ruditapes decussatus (Linneo, 1758), Mollusca Bivalvia, en la zona intermareal de la provincia de Huelva*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, España. 298 pp.
- Ruiz-Azcona, P.; Moreno, O.; Palanco, I.; Giráldez, I.; Velasco, A.; Morales, E. 2013. Temporal fluctuation of metals in seawater of the Piedras river estuary and the effects of copper on *Venerupis decussata* larvae. *Journal of Shellfish Research*, 32(2): 291-296. doi: <http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0207>
- Sánchez-Rodas, D.; Mellano, F.; Martínez, F.; Palencia, P.; Giráldez, I.; Morales, E. 2016. Speciation analysis of Se-enriched strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) cultivated on hydroponics by HPLC-TR-HG-AFS. *Microchemical Journal*, 127: 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.02.017>
- Sánchez-Rodas, D.; Mellano, F.; Morales, E.; Giraldez, I. 2013. A simplified method for inorganic selenium and selenoaminoacids speciation based on HPLC-TR-HG-AFS, *Talanta* 106: 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.005>
- Sanders, BM; Jenkins, KD; Sunda, WG; Costlow, JD. 1983. Free cupric ion activity in seawater: effects on metallothionein and growth in crab larvae. *Science* 22: 53–54
- Schlekat CE, Byeong-Gweon Lee, Luoma SN. 2002. Assimilation of selenium from phytoplankton by three benthic invertebrates: Effect of phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser* 237:79–85.
- Schlekat, C.E.; Lee, B-G; Luoma, S.N. 2002. Assimilation of selenium from phytoplankton by three benthic invertebrates: Effect of phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series*, 237: 79-85.
- Schram, E.; Pedrero, Z.; Cámara, van der Heul, C.J.W.; Luten, J.B. 2008. Enrichment of African catfish with functional selenium originating from garlic. *Aquaculture Research*, 39: 850-858.
- Schulin, R., A. Johnson y E. Frossard. 2010. Trace Element-Deficient Soils. En: *Trace elements in soils*. Ed. Peter S. Hooda. Blackwell Publishing Ltd.

- Scientific Committee for Food (SCF). 1993. *Nutrient and energy intakes for the European Community. Reports of the Scientific Committee for Food*, 31st series. Food - Science and Techniques, European Commission, Luxembourg, 248 pp.
- Scientific Committee for Food (SCF). 2000a. *Guidelines of the SCF for the development of tolerable upper intake levels for vitamins and minerals*. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels. 11pp. Report SCF/CS/NUT/UPPLEV/11 Final.
- Scientific Committee on Food (SCF). 2000b. *Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium*. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels. 18 pp. SCF/CS/NUT/UPPLEV/25 Final.
- Serafim, A., Bebianno, M.J. 2010. Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.* 99, 370–378.
- Shumilla JA, Wetterhahn KE, Barchowsky A. 1998. Inhibition of NF- κ B Binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. *Archiv. Biochem. Biophys.* 349: 356-362.
- Simkiss, K., Taylor, M.G., 1989. Metal fluxes across membranes of aquatic organisms. *Rev. Aquat. Sci.* 1: 173–188
- Simkiss, K., Taylor, M.G., 1995. Transport of metals across membranes. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley, Chichester, pp. 2–44.
- Simmons, D.B. and D. Wallschläger. 2005. A critical review of the biogeochemistry and ecotoxicology of selenium in lotic and lentic environments. *Environ. Toxic. Chem.* 24:1331-1343.
- Šindelářová, K.; Száková, J.; Tremlová, J.; Mestek, O.; Praus, L.; Kaňa, A.; Najmanová J.; Tlustoš, P. 2015. The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. italica) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation and speciation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32 (12): 2027–2038
- Smaoui-Damak, W., Berthet, B., Hamza-Chaffai, A., 2009. In situ potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1489–1498
- Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M.J., Amiard, J.C., 2004. Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia). *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 181–188.
- Smaoui-Damak, W., Rebai, T., Berthet, B., Hamza-Chaffai, A., 2006. Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus*? A one-year case study. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 252–261.

- Sokolova, I.M. 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Journal of Experimental Biology*, 207, 2639–2648
- Sokolova, I.M., A.H. Ringwood, C. Johnson. (2005). Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, 74: 218–228
- Speier, C., Baker, S.S., Newburger, P.E., 1985. Relationships between in vitro selenium supply, glutathione peroxidase activity, and phagocytic function in the HL-60 human myeloid cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 8951–8955.
- Stefanka, Z.; I. Ipolyi, M. Dernovics, P. Fodor. 2001 Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples. *Talanta*, 55: 437
- Stewart AR, Luoma SN, Schlekat CE, Doblin MA, Hieb KA. 2004. Food web pathway determines how selenium affects aquatic ecosystems: a San Francisco Bay case study. *Environ Sci Technol* 38:4519–4526.
- Stewart, AR.; Luoma, SN.; Elrick, KA.; Carter, JL.; van der Wegen, M. 2013 Influence of estuarine processes on spatiotemporal variation in bioavailable selenium. *Marine Ecology Progress Series*, 492: 41-56
- Stewart, M. G. 1978. Kinetics of neutral amino-acid transport by isolated gill tissue of the bivalve *Mya arenaria* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 32, 39–52.
- Stewart, M. G. Kinetics of neutral amino-acid transport by isolated gill tissue of the bivalve *Mya arenaria* (L.). 1978. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 32, 39–52.
- Stoffaneller, R., & Morse, N. L. 2015. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients*, 7(3): 1494–1537. <http://doi.org/10.3390/nu7031494>
- Survey Forecasting Selenium Discharges to the San Francisco Bay-Delta Estuary: Ecological Effects of a Proposed San Luis Drain Extension Professional Paper
- Suttle, N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock*, 4th ed. Eric J. Underwood (Ed.) MPG Books Group. 587 pp. ISBN 978 1 84593 472 9
- Sutton K.L., Sutton R.M.C., Stalcup A.M., Caruso J.A. 2000. A comparison of vancomycin and sulfated beta-cyclodextrin as chiral selectors for enantiomeric separations of selenoamino acids using capillary electrophoresis with UV absorbance detection. *Analyst* 125 (2): 231-234.
- Szebedinszky C, McGeer JC, McDonald DG, Wood CM. 2001. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 20:597–607.

- Szebedinszky C, McGeer JC, McDonald DG, Wood CM. 2001. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 20:597–607.
- Tang, L-J.; Chen, X.; Sun, Y-N.; Ye, J.; Lu, J.; Han, Y.; Jiang, X.; Cheng, C.C.; He, C.C.; Qiu P-H.; Li, X-K. 2011. Synthesis and biological studies of 4', 7, 8-trihydroxy-isoflavone metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105: 1623–1629. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.08.019
- Tang, X.; Xu, Z.; Wang J. 2005. A hydride generation atomic fluorescence spectrometric procedure for selenium determination after flow injection on-line co-precipitate preconcentration. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60: 1580–1585
- Tashjian, D.H., Teh, S.J., Sogomonyan, A., Hung, S.S.O., 2006. Bioaccumulation and chronic toxicity of dietary l-selenomethionine in juvenile white sturgeon(*Acipenser transmontanus*). *Aquat. Toxicol.* 79, 401–409;
- Tayfur G, Tanji KK, Baba A. 2010. Two-dimensional finite elements model for selenium transport in saturated and unsaturated zones. *Environ. Monit. Assess.*, 169(1-4):509–518.
- Taylor, A. M. 2009. Biomarkers of cadmium, lead and selenium toxicity in the marine bivalve molluscs *Tellina deltoidalis* and *Anadara trapezia*: linking exposure, dose and response. PhD Thesis, University of Canberra, Australia. pp. 303.
- Taylor, A. M. y Maher, W. A. 2012 a. Exposure–dose–response of *Anadara trapezia* to metal contaminated estuarine sediments: 3. Selenium spiked sediments. *Aquatic Toxicology*, 124–125: 152–162. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.003>.
- Taylor, A. M. y Maher, W. A. 2012 b. Exposure–dose–response of *Anadara trapezia* to metal contaminated estuarine sediments: 2. Lead spiked sediments. *Aquatic Toxicology*, 116–117: 79–89. doi:10.1016/j.aquatox.2012.02.017
- Taylor, A. M.; W. A. Maher. 2014. Exposure-dose-response of *Tellina deltoidalis* to contaminated estuarine sediments 3. Selenium spiked sediments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166: 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.007>
- Taylor, A.M. y Maher, W.A. 2012. Exposure–dose–response of *Anadara trapezia* to metal contaminated estuarine sediments 3. Selenium spiked sediments. *Aquatic Toxicology*, 124– 125: 152– 162.
- Taylor, A.M. y Maher, W.A. 2014. Exposure-dose-response of *Tellina deltoidalis* to contaminated estuarine sediments 3. Selenium spiked sediments, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 166: 34–43.

- Taylor, D. A., Nair, S. V., Thompson, E. L. and Raftos, D. A. 2015. Dose-dependent effects of metals on gene expression in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environ. Toxicol.*, 30: 989–998. doi:10.1002/tox.21972
- Thomas, J.K., Janz, D.M., 2011. Dietary selenomethionine exposure in adult zebrafish alters swimming performance, energetics and the physiological stress response. *Aquat. Toxicol.* 102, 79–86.
- Thomas, J.K., Wiseman, S., Giesy, J.P., Janz, D.M., 2013. Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 130–131, 112–122;
- Tokunaga, T. K., Gordon E. Brown, Jr., Ingrid J. Pickering, Stephen R. Sutton, and Sasa Bajt. 1997. Selenium redox reactions and transport between ponded waters and sediments. *Environmental Science & Technology*, 31 (5), 1419-1425
- Torres, M.A., Testa, C.P., Gáspari, C., Masutti, M.B., C.M.N. Panitz, Curi-Pedrosa, R., Alves de Almeida, E., Di Mascio, P., Filho, D.W., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9): 923-932.
- Trofast, J. 2011. Berzelius' discovery of selenium. *Chemistry International-IUPAC*, 33 (5).
- Tsuda, T., Nakanishi, H., Auki, S., Takebayashi, J., 1998. Bioconcentration and metabolism of butylin compounds by Carpa. *Water Research*, 22, 647-651
- Uden, P.C.; H.T. Boakye, C. Kahakachchi, R. Hafezi, P. Nolibos, E. Block, S. Johnson, J.F. Tyson. 2004. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19: 65.
- Underwood, E.J. and Mertz W. 2013, Introduction, En: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Mertz, W, Academic Press, 480 pp.
- Urrutia, G.X., Navarro, J.M., Clasing, E. y Stead, R.A. 2001. The effects of environmental factors on the biochemical composition of the bivalve *Tagelus dombeii* (Lamarck, 1818) (Tellinacea: Solecurtidae) from the intertidal flat of Coihúin, Puerto Montt, Chile. *Journal Shellfish Research*, 20(3): 1077–1087.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 2016. *Aquatic Life Ambient Water Quality Criterion for Selenium-Freshwater*. U. S. Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, D.C. (EPA 822-R-16-006)
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 2017. *National Primary Drinking Water Regulations (NPDWR)*. United States. [Consulta 22 marzo 2017] Disponible en: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
- Usero, J.; González-Regalado, E.; Gracia, I. 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast of southern Spain. *Environment International*, 23 (3): 291-298.

- van der Oost, R.; Beyer, J. Y Vermeulen N.P.E. 2003 Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Velez, C.; Figueira, E.; Soares, A.M.V.M; Freitas, R. 2016. Accumulation and sub-cellular partitioning of metals and As in the clam *Venerupis corrugata*: Different strategies towards different elements. *Chemosphere* 156 (2016) 128-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.067>
- Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Reviews in Aquatic Science*, 1(2), 295-317.
- Vinchira JE, Muñoz-Ramírez, AP. 2010. Selenio: Nutriente objetivo para mejorar la composición nutricional del pescado cultivado. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57 (1). 11 pp.
- Volland, M.; Hampel, M.; Martos-Sitcha, J.A.; Chiara Trombini, G.; Martínez-Rodríguez, J.B. 2015. Citrate gold nanoparticle exposure in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*: uptake, elimination and oxidative stress response. *Environ Environmental Science and Pollution Research*, 22: 17414-17424. doi:10.1007/s11356-015-4718-x
- Vonderheide, A.P.; K. Wrobel, S.S. Kannamkumarath, C. B'Hymer, M. Montes Bayón, C. Ponce de León, J.A. Caruso. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5722.
- Wallace W.-G. y Luoma S N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. The significance of trophically available metal (TAM). *Mar Ecol Prog Series*, 257: 125–137.
- Wallace, W. G.; Lee, B.-G.; Luoma, S. N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metalsensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*, 249: 183–197
- Wallace, W. G.; Luoma, S. N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metalsensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, 249: 183–197
- Wallschläger, D.; Feldmann, F. (2010). Formation, Occurrence, Significance, and Analysis of Organoselenium and Organotellurium Compounds in the Environment. En: *Metal Ions in Life Sciences*. Volume 7. Organometallics in Environment and Toxicology, Chapter 10. RSC Publishing. pp. 319–364.
- Wang C, Lovell RT. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 152: 223-234.
- Wang W-X and Nicholas S. Fisher. 1996 .Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition *Limnol. Oceanogr.*, 41(2), 1996, 197-207

- Wang W-X, Fisher NS. 1997. Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Progr Ser* 161:103–115.
- Wang W-X, Fisher NS. 1999. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. *The Science of the Total Environment* 237/238: 459–472.
- Wang Y, Han J, Li W, Xu Z. 2007. Effect of different selenium source on growth, performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Animal Feed Science and Technology*, 134 (3-4): 243-251.
- Wang, W.-X. 2013. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. *Chinese Science Bulletin*, 58 (2): 194-202. doi:10.1007/s11434-012-5403-9
- Wang, W.-X.; Fisher, N.S.; Luoma, S.N. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 40: 91-113.
- Wang, W.-X.; Fisher, N.S.; Luoma, S.N. 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel *Mytilus edulis*: effects of algal food abundance. *Marine Ecology Progress Series*, 129: 165-176;
- Wang, W-X. 2001. Comparison of metal uptake rate and absorption efficiency in marine bivalves. *Environ. Toxicol.Chem.* 20, 1367–1373.
- Wang, W-X. 2002. Cd and Se aqueous uptake and exposure of green mussels *Perna viridis*: influences of seston quantity. *Marine Ecology Progress Series*, 226: 211–221.
- Waschulewski, I.; Sunde, R. 1988. Effect of dietary methionine on utilization of tissue selenium from dietary selenomethionine for glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.*, 118 (3): 367–374
- Waschulewski, I.; Sunde, R. Effect of dietary methionine on utilization of tissue selenium from dietary selenomethionine for glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.*, 118 (3): 367–374
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151: 185–207.
- Weekley, C.M.; Harris, H.H. 2013. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chemical Society Reviews* 42, 8870–8894. doi: 10.1039/C3CS60272A
- Wen, H. and Carignan, J. 2007. Reviews on atmospheric selenium: Emissions, speciation and fate, *Atmospheric Environment (Atmos. Env.)* 41, 7151–7165.
- Whanger, P. D. 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of American College Nutrition*, 21 (3), 223–232.

- Whanger, P. D. 2002. Selenocompounds in Plants and Animals and Their Biological Significance. *Journal of American College Nutrition*, 21 (3): 223–232)
- White, S.L., Rainbow, P.S.. 1982. Regulation and accumulation of copper, zinc, and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Marine Ecology Progress Series*, 8: 95–101.
- WHO (World Health Organization). 1996. *Trace Elements in Human Nutrition and Health*. Geneva: WHO. 343 pp. ISBN 9241561734
- WHO (World Health Organization). 2011. Selenium in Drinking-water. Background document for development of *WHO guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO. 22 pp. WHO/HSE/WSH/10.01/14
- WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*, in Second edition of report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21-30 September 1998. Geneva: WHO. 341 pp. ISBN 92 4 154612 3
- Winkel, L.H.E., Vriens, B., Jones, G. D., Schneider, L. S., Pilon-Smits, E. and Bañuelos, G. S. 2015. Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review. *Nutrients*, 7, 4199-4239.
- Wiseman, S., Thomas, J.K., Higley, E., Hursky, O., Pietrock, M., Raine, J.C., Giesy, J.P., Janz, D.M., Hecker, M., 2011. Chronic exposure to dietary selenomethionine increases gonadal steroidogenesis in female rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 105, 218–226.
- Wiseman, S., Thomas, J.K., McPhee, L., Hursky, O., Raine, J.C., Pietrock, M., Giesy, J.P., Hecker, M., Janz, D.M., 2011b. Attenuation of the cortisol response to stress in female rainbow trout chronically exposed to dietary selenomethionine. *Aquat. Toxicol.* 105, 643–651.)
- Wood S. M., Beckham C., Yosioka A., Darban H. & Watson R. R. 2000. B-carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integrative Medicine*, 2: 85-92.
- Wrench, J.J., 1979. Uptake and metabolism of selenium by oysters. *Marine Science Communications*, 5 (1): 47–59.
- Wright DA. 1995. Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. *Mar Pollut Bull* 31:8–18
- Wright SH, Manahan DT. 1989. Integumental nutrient uptake by aquatic organisms. *Ann Rev Physiol* 51:585–600
- Wrobel, JK; Power, R y Toborek, M. 2016. Biological activity of selenium: Revisited. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 68(2): 97–105 doi: 10.1002/iub.1466.

- Xunta de Galicia. 1991. Cultivo almejas. Curso acuicultura.
- Yavaşoğlu, A.; Özkan, D.; Güner, A.; Katalay, S.; Oltulu, F.; Karabay Yavaşoğlu, N. 2016. Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 109 (1): 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.084>
- Yin, T.; Yang, L.; Liu, Y.; Zhou, X.; Liu, J. 2016. Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12 (2): 575. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.357>
- Zhang L, Wang W X. 2006. Significance of subcellular metal distribution in prey in influencing the trophic transfer of metals in a marine fish. *Limnol Oceanogr*, 51: 2008–2017
- Zhang Y, Gladyshev VN. 2008. Trends in Selenium Utilization in Marine Microbial World Revealed through the Analysis of the Global Ocean Sampling (GOS) Project. *PLoS Genet*, 4 (6): e1000095.
- Zhang, J.; Li, H.; Qin, Y.; Ye, S.; Liu, M. 2016. Identification of functional genes involved in Cd²⁺ response of Chinese surf clam (*Macra chinensis*) through transcriptome sequencing. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 41: 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.006>.
- Zhang, L. and Wang, W.-X. 2006. Significance of subcellular metal distribution in prey in influencing the trophic transfer of metals in a marine fish. *Limnol. Oceanogr.*, 51(5): 2008–2017.
- Zhang; G. H.; Hu; M. H. Huang; Y. Harrison. P. J.MP. 1990. Se uptake and accumulation in marine phytoplankton and transfer of se to the clam *Puditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research* 30: 179-190
- Zhao L, Zhang Y, Liang J, Xu X, Wang H, Yang F, Yan X. 2014. Environmental cadmium exposure impacts physiological responses in Manila clams. *Biological Trace Element Research*, 159: 241–253. doi:10.1007/s12011-014-9975-x
- Zheng J., Shibata Y., Furuta N. 2003. Determination of selenoamino acids using two-dimensional ion-pair reversed phase chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 59: 27-36.
- Zheng, J., Greschonig, H., Liu, F., Kosmus W. 2000. The chemical forms of selenium in selenium nutritional supplements: an investigation by using HPLC/ICP/MS and GF/AAS. *Trace Elements and Electrolytes*, 17: 40-47.

Capítulo 8.

ANEXOS

CAPÍTULO 8

ANEXOS

Los artículos que forman parte del capítulo 8 “Anexos” han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. En sustitución del artículo ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista, y resumen.

- Mellano, F., Bujalance, M., Giráldez, I., Ruiz Azcona, P., Sánchez Rodas, D., Morales, E. (2013). Determination of selenomethionine and seleno-methyl-selenocysteine in biota by ultrasonic-assisted enzymatic digestion and multi-shot stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1300, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.029>

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.029>

RESUMEN:

A method based on stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption (TD)–gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) has been optimized for the determination of seleno-methyl-selenocysteine (SeMetSeCys) and selenomethionine (SeMet) in biota samples. Aliquots of freeze-dried tissue, a mixture of protease XIV-lipase and water were sonicated for 2 min. After extraction, the extract was separated by centrifugation and subjected to derivatization and SBSE–TD–GC–MS. The parameters affecting derivatization, absorption and desorption steps were investigated. The optimized conditions consist of a derivatization with 40 μL of ethyl chloroformate (ECF) in 400 μL of a water:ethanol:pyridine (60:32:8) mixture, followed by dilution to 1.5 mL of 70 g NaCl L⁻¹ in water at neutral pH and an extraction step using 10 mm \times 1 mm PDMS stir bar, stirring at 800 rpm for 20 min at room temperature (23 ± 1 °C). Three stir bars were used for the extraction of three different aliquots of the same sample and then placed in a single glass desorption liner and simultaneously desorbed for GC–MS analysis. The desorption step required the following conditions: 300 °C (desorption temperature), 6 min (desorption time), 50 mL min⁻¹ (vent flow) and -5 °C (cryotrapping temperature). The method provided precise (8.1%) and accurate results in the mg Se kg⁻¹ range (using the selected-ion monitoring-SIM mode) against certified reference material SELM-1 yeast, with recoveries higher than 80% for spiked algae and clams samples.

- Giráldez, I., Ruiz Azcona, P., Vidal, A., Morales, E. (2015). Speciation of selenite and selenoamino acids in biota samples by dual stir bar sorptive extraction-single desorption-capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 122, 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.007>

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.007>

RESUMEN:

A method of speciation of selenite (Se(IV)), selenomethionine (SeMet) and selenomethylselenocysteine (SeMeSeCys) has been developed in clams. It is based on dual stir bar sorptive extraction (dual-SBSE) coupled to thermal desorption (TD) and capillary gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) operating in selected ion-monitoring mode (SIM). Samples are extracted by ultrasonic probe assisted enzymatic hydrolysis. Se(IV) is derivatized to selenol and selenoamino acids to the N-isobutoxycarbonyl methyl ester derivatives and diluted with water prior to SBSE. The optimised method consists of a dual SBSE extraction performed on both derivatized extracts. After extraction, the two stir bars are placed in a single glass thermal desorption liner and simultaneously desorbed. The method showed good linearity ($R > 0.999$), high sensitivity (limits of detection of 0.008, 0.070 and 0.180 ng as Se for Se(IV), SeMet, SeMeSeCys, respectively), reproducibility (better than 13%) and recoveries (higher than 85%). The accuracy of the analytical method applied to the determination of SeMet was studied in the certified reference material SELM-1 yeast, and no significant differences were found between the determined value (1419 ± 115 mg Se kg⁻¹) and the certified value (1364 ± 70 mg Se kg⁻¹). The method was applied to the speciation analysis of selenium in clams exposed to waterborne Se(IV) (750 µg Se L⁻¹), SeMeSeCys (10 µg Se L⁻¹) and SeMet (10 µg Se L⁻¹) for two months.

TEMPORAL FLUCTUATION OF METALS IN SEAWATER OF THE PIEDRAS RIVER ESTUARY AND THE EFFECTS OF COPPER ON *VENERUPIS DECUSSATA* LARVAE

P. RUIZ-AZCONA,^{1*} O. MORENO,¹ I. PALANCO,¹ I. GIRÁLDEZ,² A. VELASCO² AND E. MORALES²

¹IFAPA Centro "Agua del Pino," Apdo.104, Huelva, Spain; ²Universidad de Huelva, Avda. Fuerzas Armadas, s/n. 21071, Huelva, Spain

ABSTRACT Metal concentrations were measured in seawater in the Piedras River estuary (southwest Spain) for 15 mo during 2005 to 2006. A significant sinusoidal seasonal variation of Cu and Zn was observed. The Cu levels were up to 30 µg/L. Effects of Cu concentrations, ranging from 0–100 µg/L, and exposure times of 48 h, 72 h, and 96 h on both mortality and a lethal concentration (LC50) of *Venerupis decussata* (Linnaeus 1758) larvae were studied. Larval mortality was 100% 96 h after exposure to 100 µg Cu/L, and mobility decreased after exposure to 100 µg Cu/L for 48 h or longer. Lethal concentrations for 48 h, 72 h, and 96 h were set at 190, 97, and 49 µg Cu/L, respectively. Results indicated that Cu concentrations recorded in Piedras River estuary (up to 30 µg/L) did not affect 96-h larval development of *V. decussata*.

KEY WORDS: clam larvae, copper, heavy metals, Piedras River estuary, toxicity, *Venerupis decussata*

INTRODUCTION

The clam *Venerupis decussata* (Linnaeus 1758) is a natural fishery resource along the southwest coast of Spain. It has high economic value and an interest for aquaculture (Peña et al. 2005).

European legislation on water quality for shellfish rearing establishes that concentrations of metals and other persistent pollutants must be below the level to affect molluscs and their larvae (CEC 1979). Early developmental stages are most sensitive during in the life cycle of bivalves, which are highly sensitive to micropollutants—metals in particular (Martin et al. 1981, Pavčić et al. 1994, His et al. 1999a). Metal concentrations that are lethal to embryos and larvae are orders of magnitude less than those that are lethal for adults (Connor 1972).

Natural seawater for culturing *Venerupis decussata* was taken from the Piedras River estuary mouth (Huelva coast, southwest Spain). This estuary is small and narrow (10 km²), with reduced river water input and a wide spit at the mouth, in which the apex expands a wide system of ebb-tide deltas (Morales et al. 2001). The estuary is subject to a mesotidal regime, with tidal amplitude varying from 3.37 m at spring tide to 0.75 m at neap tide; the tidal creek has an average overall depth of 2.10 m (Borrego & Pendón 1989). This area is also subjected to sewage, and industrial, marina, and agricultural effluents that affect marine organisms. Therefore, chemical pollution of seawater poses a risk to bivalve culture.

Copper is used primarily in aquaculture to control fin rot and skin lesions (Davis 1953, Leitritz & Lewis 1980, Gratzek et al. 1992), to control external parasites of fish (Cardelino & Whittaker 1988, Gratzek & Biasiola 1992), and to decrease hatchery mortality of larval fish (Chen et al. 2006). Copper is one of the most toxic metals, along with mercury and silver, to marine phytoplankton (Sunda & Guillard 1976) and bivalve larvae (His et al. 1999a), echinoderm (Kobayashi 1995), and crustacean larvae (Young et al. 1979).

Consequently, the risks posed by local pollutants to the larval and juvenile stages of aquaculture species need to be

evaluated because the quality of the natural seawater from the Piedras River has decreased markedly during the past few years.

Therefore, the aims of the current study were to evaluate (1) the temporal fluctuation of metals in natural seawater and (2) the effects of waterborne Cu exposure on development and survival rate of *Venerupis decussata* larvae cultured in artificial seawater.

MATERIALS AND METHODS

Natural Seawater of the Piedras River Estuary

Natural seawater was obtained from the mouth of the Piedras River estuary (Huelva Coast, southwest Spain); its chemical composition is summarized in Table 1. Water samples were collected to study the temporal fluctuation of metals for 15 mo between October 2005 and December 2006 at low tide during spring tide. During the first 4 mo, water samples were collected every 15 days at low and high tides during the autumn tide.

Artificial seawater

Artificial seawater was used in this study for larval culture. The seawater was prepared according to Clesceri et al. (1989), adjusting salinity to 34 g/L. Salts were added to double-distilled water by waiting before adding a salt until the previous salt was solubilized. All reagents were of analytical or Suprapur® grade (Merck, Darmstadt, Germany). The chemical composition is summarized in Table 1.

Adult Conditioning

Unconditioned broodstock of *Venerupis decussata* (anteroposterior axis, 35–49 mm) were obtained from field sites off the Atlantic coast (Huelva, southwest Spain) and the Cantabric coast (Asturias, northwest Spain) in February 2007.

Clams were acclimated for 3 mo in the laboratory, with natural seawater (36 g/L) heated to 20 ± 1°C, in a tray (78 × 33 × 18 cm) supported off the bottom, with 50–60 adults (1 kg per tray) with a water flow rate of 1 L/min/kg. A mixed algal diet (*Isochrysis galbana* T-Iso, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros*

*Corresponding author. E-mail: mariap.ruizazcona@juntadeandalucia.es
DOI: 10.2983/035.032.0207

TABLE 1.
Chemical composition of artificial seawaters (ASW)
and Piedras River estuary waters.

	ASW	Piedras River
pH	7.6 ± 0.07	7.84 ± 0.06
Conductivity (mS/cm)	52.7 ± 1.6	53.3 ± 4.0
Salinity (g/L)	34.0 ± 1.0	34.1 ± 2.6
Alkalinity (as CaCO ₃ , mg/L)	132 ± 9	142 ± 3
Sulfate (mg/L)	2,885 ± 67	3,041 ± 8
Chloride (mg/L)	19,656 ± 142	20,331 ± 140
Calcium (mg/L)	320 ± 7	305 ± 3
Magnesium (mg/L)	1,163 ± 84	1,533 ± 32
Water hardness (as CaCO ₃ , mg/L)	5,584 ± 348	7,130 ± 274
Sodium (mg/L)	8,238 ± 453	9,844 ± 321
Potassium (mg/L)	381 ± 9	393 ± 5

gracilis, and *Stretionema costatum*) of 6% of the dry meat weight of the adults was added (Utting & Millican 1997, Ojeda et al. 2007).

Several mature clam batches were induced to mass spawn by thermal shock at 28–30°C in filtered seawater (Castagna & Krauter 1981).

Larval Rearing

Gametes developed into D-larvae after 24 h in the spawning tanks at 24°C. D-stage veliger larvae were collected using a 40-µm nylon sieve and glass beakers. Previously, all glassware was autoclaved. The larval total was determined by counting using an optical microscope (Olympus CH-2 light microscope) in conjunction with a Bausch and Lomb WP 7854 stereoscope, and size determinations were made using a monocular microscope with eyepiece micrometer.

The D-larvae were stocked into batches at 10 larvae/mL and suspended in 1- or 4-L glass beakers. Experimental cultures were conducted in artificial seawater because it is free of heavy metals. Seawater was spiked with Cu at varying concentrations (described in the next section).

Three replicates were used for each Cu concentration, and the artificial seawater was renewed 100% 3 times/wk (every 2–3 days), and continuous aeration was provided. Each screen used was assigned to each specific batch to avoid cross-contamination among groups. Mean salinity was 36 g/L, and seawater was maintained at 20°C by control of ambient air temperature. During this time, daily feeding was 50 cells T-Iso/µL.

Analysis of Trace Metals and Chemical Exposure

Trace metals in filtered (<0.40 µm) seawater samples were determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Hewlett Packard, Palo Alto, CA) (Gomez-Ariza et al. 1999). A multistandard metal solution was obtained from Merck, and a working solution was prepared with 5% of Suprapur® grade HNO₃ (Merck). Water used in all analyses was distilled and then treated in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Copper stock solutions were prepared using copper chloride in double-distilled water. Test concentrations were prepared by diluting the stock solution in artificial seawater.

Different experiments were conducted with different exposure times (48, 72, and 96 h) and copper concentrations (0, 30, 50, 100, and 200 µg/L) in artificial seawaters to study the copper effects on larval development of *Venerupis decussata*. In all treatments, the water quality parameters were within the acceptable range for larval development of marine invertebrates (Helm et al. 2004).

Statistical Analysis

Prior to analysis, all data were tested for homogeneity of variance using the Bartlett and Levene tests. A parametric statistical test (Student's *t*-test) was applied to different hypothesis. Data were analyzed by multiple comparisons of means with ANOVA, using STATISTICA, version 6 (StatSoft, Inc.). The significance level for all analyses was set at $P < 0.05$.

The concentration of Cu that kills 50% of larvae (LC50) and the concentration of Cu that causes 50% inhibition of normal larval development (EC50) were determined by probit analysis (piecewise linear regression analysis) using measured concentrations of dissolved Cu at the beginning of the experiment ($t = 0$).

RESULTS

Natural Seawater of Piedras River Estuary

Temporal evaluation of metals in Piedras River estuary waters from October 2005 to December 2006 showed the presence of Fe, Zn, Cu, Cr, As, Se, V, Co, and Ni, and there were no significant differences for anlyte concentrations between high tide and low tide (ANOVA, $P > 0.070$). Manganese, Ag, Cd, Ti, Se, and Pb were below detection limits. Metal concentrations in seawater decreased as follows: Fe > Zn > Cu > Cr > As > V > Ni > Co.

A sinusoidal seasonal variation for Cu and Zn was observed (ANOVA, $P < 0.005$). Copper concentration ranged between 27 ± 1 µg/L and 35 ± 2 µg/L, whereas for Zn the concentration ranged between 56 ± 2 µg/L and 68 ± 3 µg/L.

Fluctuation of Cu in Artificial Seawater Culture During Larval Rearing

The fluctuation of Cu concentrations in artificial seawater culture before and after exposure during larval rearing is presented in Figure 1. No significant differences were detected in the control group and in 30 µg/L Cu (ANOVA, $P > 0.096$). However, Cu concentrations in the seawater decreased to 89%, 84%, and 74% after 48 h, 72 h, and 96 h using a 100-µg/L Cu exposure (ANOVA, $P < 0.014$), respectively, which suggests that the larvae accumulated Cu after exposure to a high Cu concentration.

Copper Effect on Larval Development of *Venerupis decussata*

Larval motility decreased and abnormal D-larvae (D-larvae with convex hinge, incomplete shell, and protruding mantle) increased with exposure times of Cu. Survival of *Venerupis decussata* after exposure to different copper concentrations after 48 h, 72 h, and 96 h in different experiments is presented in Figure 2. A large variation in larval quality was observed when comparing survival rates of controls between different experiments (larval quality refers to the physiological condition and the capacity of larvae to grow and survive under various environmental conditions during its life cycle (Racotta et al.

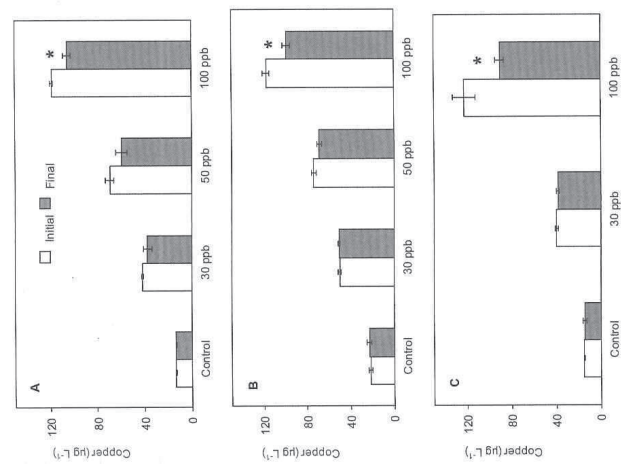


Figure 1. (A–C) Evaluation of copper concentration before (open box) and after (solid box) its exposure in artificial seawater for 3 experiments of larval culture, at 48 h (A), 72 h (B), and 96 h (C), ppb, µg/L. Error bars represent ± SD. Means are based on 3 replicates. *Significant differences.

2003)). There were no significant differences in survival at 48 h and 72 h (ANOVA, $P > 0.284$) for all Cu concentrations ranging from 0–100 µg/L. Survival at 100 µg/L (0%) was significantly less than 0 µg/L and 30 µg/L at 96 h of exposure (ANOVA, $P > 0.0001$).

DISCUSSION

In the current study, the concentration of Cu found in water from the Piedras River estuary (30 µg/L) should be toxic to the

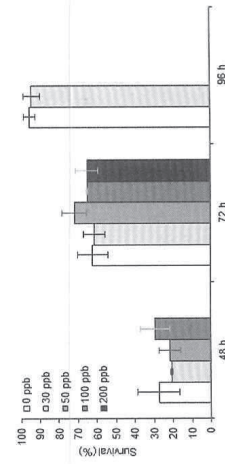


Figure 2. Survival of *Venerupis decussata* in a different experiment with exposures to different copper concentrations after 48 h, 72 h, and 96 h, ppb, µg/L. Error bars represent ± SD. Means are based on 3 replicates.

development of embryonic and larval stages in *Venerupis decussata*. Zinc concentrations, however, were not toxic (Jones 2006). For example, a Cu level greater than 6 µg/L in the water supply caused a significant reduction in development of *Crassostrea gigas* embryos, whereas at 10 µg/L, only 50% developed normally; at more than 12.0 µg/L, there were a decreasing percentage of larvae that showed normal embryonic development (Coglianese & Martin 1981). However, the concentration of the others metals did not affect marine invertebrates (Jones 2006).

The sources of Cu in the water column may be the result of the use of pesticides in strawberry and orange cultivation, parasite-preventive measures in fish (gillhead seabream and sea bass), and antifouling paints for boats. Copper-based protectants serve as both a bactericide and a fungicide, and are applied by ground spraying onto plants (Arnold et al. 2004). Copper is also used to control external parasites in fish in marine aquaria (Cardellhaac & Whitaker 1988, Gratzek & Blasiola 1992), and is a main component of antifouling paints used on marine vessels less than 25 m in length (Seilinger 1989, Classe & Alzieu 1993). At the mouth of the Piedras River, Cu pollution was significant near the sportive harbor, fine sands in the channel border shows the highest geo-accumulation indices for Cu for this estuary (Ruiz 2001).

Values of LC50 and EC50 published by several authors in different species of marine invertebrates and in our study are shown in Table 2. There are few published data available for toxicity testing of Cu in developing clam larvae. Beiras and Albertosa (2004) and Fathallah et al. (2010) studied metal effects on embryo development of *Venerupis decussata*. They obtained values for EC50 of 9 µg Cu/L at 48 h and 46.3 µg Cu/L at 24 h, respectively. These values are 9.5 times less than those found in our study (EC50 was seen at 80 µg Cu/L at 72 h). These differences may be caused by different developmental stages; the embryonic stage is much more sensitive than the larval stage, even at lower levels of exposure. It has been reported by several authors for others marine invertebrates (Calabrese et al. 1973, His & Robert 1981, Vlasova & Khristoforova 1982, Dinnel et al. 1987, Ringwood 1992, Beiras & His 1994, Hoare et al. 1995a, Hoare et al. 1995b, Cima et al. 1996, Bellas et al. 2001, Novelli et al. 2003, Fitzpatrick et al. 2008). On the other hand, increasing exposure time (from 48–96 h) leads to an increase in toxicity and, hence, lower LC50 values (from 190 µg/L Cu to 49 µg/L Cu). Similar results have been reported by others (LaBreche 1998, Dietrich & Gallagher 2002, LaBreche et al. 2002, Ferrer et al. 2006). In addition, the different LC50 and EC50 values at similar exposure times in these studies may result from species-specific differences in larval sensitivity to Cu. For example, the 48-h LC50 values of Cu on the survival of larvae from the clams *Mercuraria mercenaria* and *V. decussata*, the first zoeae of the crab *Chasmagnathus granulata*, and the young crab *Chasmagnathus granulata* were 62.4 µg/L (LaBreche 1998, LaBreche et al. 2002), 190 µg/L (current study), and 371 µg/L and 150.4 µg/L (Ferrer et al. 2006), respectively.

Differences in experimental procedures and conditions among the studies may have influenced the results, such as the use of either natural or artificial, organic-free filtered seawater; life stages of marine invertebrates; density; and seawater volume. In our study, artificial seawater with a medium larvae density (10–14 larvae/mL) and a high volume of seawater (1000 mL and 4000 mL) was used. In case of natural seawater, dissolved organic matter had a clearly protective effect, reducing the

TABLE 2.
LC50 or EC50 value of copper for marine invertebrates.

Species	Experiment	Time	Cu (µg/L)	Experimental conditions	Reference
Northern quahog <i>Mercenaria mercenaria</i>	Embryo survival	48 h, LC50	20	Viols containing 10 mL (55 larvae/mL)	Arnold et al. (2004)
Northern quahog <i>M. mercenaria</i>	Larvae survival	12 days, LC50	16.4	10,000–12,000 larvae (10–2 larvae/mL), natural seawater	Calabrese et al. (1977)
Northern quahog <i>M. mercenaria</i>	Larvae survival	48 h, LC50	62.4	30-mm plastic Petri plate technique, 1.5 mL, artificial seawater	LaBreeche et al. (2002)
Clam <i>Venerupis decussata</i>	Larvae survival	48 h, LC50	21.2	1,000 mL and 4,000 mL (12–14 larvae/mL), seawater	Current study
Clam <i>V. decussata</i>	Embryogenesis	48 h, EC50	9.1	20 (20 eggs/mL), 20 mL, artificial seawater	Beiras and Albertosa (2004)
Clam <i>V. decussata</i>	Embryogenesis	24 h, EC50	46.3 µM	400 embryos/mL, 15 mL, artificial seawater	Fathallah et al. (2010)
Clam <i>Mulinia laterales</i>	Embryo survival	48 h, LC50	38	Viols containing 10 mL (55 larvae/mL)	Arnold et al. (2004)
Bivalve clams	Larvae	48 h, EC50	37.8		His et al. (1999a)
Oyster <i>Crassostrea gigas</i>	Embryos	96 h, LC50	21		Dietrich and Gallagher (2002)
Oyster <i>C. gigas</i>	Embryo development	192 h, LC50	12	28 mL (5.5 larvae/mL)	Worboys et al. (2002)
Oyster <i>C. gigas</i>	Larvae development	32 h, EC50	2.72	250 mL (2.4–2.8 eggs/mL)	Martin et al. (1981)
Oyster <i>Crassostrea virginica</i>	Larvae survival	48 h, EC50	2.12		His and Robert (1981)
Oyster <i>C. virginica</i>	Embryo survival	48 h, EC50	10	25 mL (12 fertilized eggs/mL)	His et al. (1999b)
Oyster <i>C. gigas</i>	Embryo survival and development	48 h, LC50	14.8	1,000 mL (10–12 larvae/mL)	Calabrese et al. (1977)
Mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Normal embryo, larvae development	48 h, LC50	48.4	1,000 mL (1.5–17 eggs/mL), synthetic seawater	Calabrese et al. (1973)
Mussel <i>M. galloprovincialis</i>	Normal embryo, larvae development	48 h, LC50	10	250 mL (15–17 eggs/mL), seawater samples from North San Diego Bay	Coglianesse and Martin (1981)
Mussel <i>M. galloprovincialis</i>	Normal embryo, larvae development	EC50	6.36	750 mL (60 embryos/mL), seawater samples from North San Diego Bay	Rosen et al. (2008)
Mussel <i>M. galloprovincialis</i>	Normal embryo, larvae development	EC50	8.68	750 mL (60 embryos/mL), seawater samples from North San Diego Bay	Rosen et al. (2008)
Mussel <i>M. galloprovincialis</i>	Normal embryo, larvae development	48 h, EC50	12.8	750 mL (60 embryos/mL), seawater samples from South San Diego Bay	Rosen et al. (2008)
Mussel <i>Mytilus edulis</i>	Embryo development	48 h, EC50	2.3	250 mL (2.4 egg/mL)	Martin et al. (1981)
Mussel <i>M. galloprovincialis</i>	Embryogenesis	48 h, EC50	10	20 mL (20 eggs/mL)	Beiras and Albertosa (2004)

toxicity of metal to marine invertebrates (Lorenzo et al. 2002). On the other hand, the use of a small volume of seawater and medium and high larval densities may increase larval stress and decrease the larvae survival during Cu exposure. Postexperiment analysis of Cu in the water was not possible in a small volume. A large variation in larval quality was observed when comparing survival rates of controls among different experiments.

LITERATURE CITED

- Arnold, G. L., M. Luckenbach, & M. A. Unger. 2004. Runoff from tomato cultivation in the estuarine environment: biological effects of farm management practices. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298:323–346.
- Beiras, R., & M. Albertosa. 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Venerupis decussata* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals: implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture* 230:205–213.
- Beiras, R., & E. His. 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113:95–103.
- Bellas, J., E. Vázquez & R. Beiras. 2001. Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. *Water Res.* 35:2905–2912.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by a grant from JACUMAR "Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de Almejas" 2004–2006. We thank Servicios Centrales de Investigación of Huelva University for the use of the ICP-MS, and Rafael Carrasco for his help with the ICP-MS.

- Borrego, J. & J. G. Pendón. 1989. Caracterización del ciclo marañal en la desembocadura del río Piedras (Huelva). In: *Actas XII Congreso Español de Sedimentología (Bilbao)*. Grupo Español de Sedimentología, editor. Barcelona, pp. 280 (97–100).
- Calabrese, A., R. S. Collier, D. A. Nelson & J. R. MacInnes. 1973. The toxicity of heavy metals to the embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 18:162–166.
- Calabrese, A., J. C. MacInnes, J. R. Nelson & J. E. Miller. 1977. Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Mar. Biol.* 41:179–184.
- Cardellach, P. & B. Whitaker. 1988. Copper treatments: uses and precautions. *Ver. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 18:435–448.
- Castagna, M. A. & J. N. Krenner. 1981. Manual for growing the hard clam *Mercuraria*. Special report of Applied Marine Science Ocean Engineering, 249. Gloucester Point, VA: Virginia Institute Marine Science. 110 pp.
- CBC (Council of the European Communities). 1979. Council Directive of 30 October 1979 on the quality required of shellfish waters (79/923/EEC). *Official Journal of the European Communities* L281, 47.
- Chen, M. F., J. A. Apperson, G. D. Marty & Y. W. Cheng. 2006. Copper sulfate treatment decreases hatchery mortality of larval white seabass *Atractosteomus nobilis*. *Aquaculture* 254:102–114.
- Cima, F., L. Ballarín, G. Bressa, G. Martinucci & P. Burighele. 1996. Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate (*Spydella tunicata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35:174–182.
- Chaise, D. & C. Azieu. 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulation. *Mar. Pollut. Bull.* 26:395–397.
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg & R. R. Trussell, eds. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th Ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington, DC, pp. 1624.
- Coglianesse, M. P. & M. Martin. 1981. Individual and interactive effects of environmental stress on the embryonic development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* I: the toxicity of copper and silver. *Mar. Environ. Res.* 5:13–21.
- Connor, P. M. 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3:190–192.
- Davis, H. S. 1953. Culture and diseases of game fishes. Berkeley, CA: University of California Press. 331 pp.
- Dietrich, A. M. & D. L. Gallagher. 2002. Fate and environmental impact of pesticides in plastic mulch production runoff: field and laboratory studies. *J. Agric. Food Chem.* 50:4409–4416.
- Dinnel, P. A., J. M. Link & Q. J. Stober. 1987. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:23–32.
- Fathallah, S. M., M. N. Medhoub, A. Medhoub & M. M. Kraiem. 2010. Toxicity of Hg, Cu and Zn on early developmental stages of the European clam (*Venerupis decussata*) with potential application in marine water quality assessment. *Environ. Monit. Assess.* 171: 661–669.
- Ferrer, L., S. Andrade, R. Astasuain & J. Marcovecchio. 2006. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chamagnathus granulata* from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65:209–217.
- Fitzpatrick, J. L., S. Nadelia, C. Bucking, S. Balshine & C. M. Word. 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 147:441–449.
- Gomez-Ariza, J. L., I. Gráñdez, D. Sánchez-Rodas, T. Acuña & E. Morales. 1999. The use of transplanted *Venerupis decussata* to evaluate the pollution of heavy metals and tributyltin in marinas. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 75:107–120.
- Gratzek, J. B. & G. C. Blasiola. 1992. Checklist quarantine procedures and calculations of particular use in fish health management. In: J. B. Gratzek & J. R. Matthews, editors. *Aquaculture: the science of fish health management*. Morris Plains, NJ: Tetra Press. pp. 301–315.
- Gratzek, J. B., E. B. Shotts Jr. & D. L. Dawe. 1992. Infectious diseases and parasites of freshwater ornamental fish. In: J. B. Gratzek & J. R. Matthews, editors. *Aquaculture: the science of fish health management*. Morris Plains, NJ: Tetra Press. pp. 227–274.
- Helm, M. M., N. Bourne & A. Lovatelli, editors. 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fisheries technical paper no. 471. Rome: FAO. 177 pp.
- His, E., R. Beiras & M. N. L. Seaman. 1999a. The assessment of marine pollution: bioassays with young embryos and larvae. In: A. I. Southward, P. A. Tyler & C. M. Young, editors. *Advances in marine biology*, Vol. 37. London: Academic Press, pp. 1–178.
- His, E., I. Heywang, O. Gelfand & X. Montaudouin. 1999b. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33:1706–1718.
- His, E. & R. Robert. 1981. Effects of copper chloride on the eggs and D-larvae of *Crassostrea gigas* (Thunberg): preliminary results. *Comm. Meet. Int. Coun. Explor. Sea*. CM-ICES/F: 43.
- Hoare, K., A. R. Beaumont & J. Davenport. 1995a. Variation among populations in the resistance of *Mytilus edulis* embryos to copper: adaptation to pollution? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120:155–161.
- Hoare, K., J. Davenport & A. R. Beaumont. 1995b. Effects of exposure and previous exposure to copper on growth of veliger larvae and survivorship of *Mytilus edulis* juveniles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120:163–168.
- Jones, J. B. 2006. Why won't they grow? Inhibitory substances and mollusc hatcheries. *Aquacult. Int.* 14:395–403.
- Kobayashi, N. 1995. Bioassay data for marine pollution using echinoderms. In: P. N. Cheremisinoff, editor. *Encyclopedia of environmental control technology*, Vol. 9. Houston, TX: Gulf Publishing, pp. 530–609.
- LaBreeche, T. M. C. 1998. Copper toxicity to larval *Mercuraria mercenaria* (hard clam). Master's thesis, Virginia Tech.
- LaBreeche, T. M. C., A. M. Dietrich, D. L. Gallagher & N. Shepherd. 2002. Toxicity of copper to *Mercuraria mercenaria* (hard clam). *Environ. Toxicol. Chem.* 21:760–766.
- Leitritz, E. & R. C. Lewis. 1980. Trout and salmon culture (hatchery methods). California fish bulletin no. 164. Oakland, CA: University of California Agricultural and Natural Resources Publications. 197 pp.
- Lorenzo, J. I., O. Nieto & R. Beiras. 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* 58:37–41.
- Martin, M., K. E. Osborn, P. Blig & N. Glickstein. 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12:305–308.
- Morales, J. A., J. Borrego, I. Jiménez, J. R. Monterde & N. Gil. 2001. Morphostratigraphy of an ebb-tidal delta system associated with a large spit in the Piedras estuary mouth (Huelva coast, southwest Spain). *Mar. Geol.* 172:225–241.
- Novelli, A. A., C. Lasso, P. F. Ghetti & A. V. Ghirardini. 2003. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidae): comparisons with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:1295–1301.
- Ojea, J., A. Silva, D. Martínez, S. Novos, P. García-Martínez & M. Abad. 2007. Condiciones óptimas para el acondicionamiento de la almeja fina, *Venerupis decussata* L. 1758, en criadero. XI Congreso Nacional de Acuicultura "Cultivando el Futuro". Libro de actas Tomo I-II. Sesión temática: Cultivo de moluscos. Vigo: Gráficas Salnés S.L., pp. 391–394.
- Pavlice, J., B. Smođis, M. Skreblin, I. Kregar & P. Stegner. 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations: 2. Stage-specific fluctuations in sensitivity towards Zn and Cd and their bioaccumulation in veliger larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 109:37–46.

- Peña, M., A. Royo, J. Ortiz & P. Ruiz-Azcona. 2005. Localización de superficies aptas para el engorde de almejas en la zona intermareal del río Piedras (Cartaya, Huelva, SW España). (X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía, Valencia, Spain). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4). pp. 343-351.
- Racotta, I. S., E. Palacios & A. M. Ibarra. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227:107-130.
- Ringwood, A. H. 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22:288-295.
- Rosen, G., I. Rivera-Duarte, C. Bart, A. Ryan, R. C. Santore & P. R. Paquin. 2008. Critical tissue copper residues for marine bivalve (*Mytilus galloprovincialis*) and echinoderm (*Strongylocentrotus purpuratus*) embryonic development: conceptual, regulatory and environmental implications. *Mar. Environ. Res.* 66:327-336.
- Ruiz, F. 2001. Trace metals in estuarine sediments from the southwestern Spanish coast. *Mar. Pollut. Bull.* 42:482-490.
- Selinger, B. 1989. Chemistry in the marketplace. 4th Ed. Sydney: Harcourt Brace Jovanovich. pp. 674.
- Sunda, W. & R. R. L. Guillard. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34:511-529.
- Utting, S. D. & P. F. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155:45-54.
- Vlasova, G. A. & N. K. Khristoforova. 1982. The effect of cadmium on early ontogenesis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Soviet J. Mar. Biol.* 8:210-215.
- Worboys, M. W., K. M. Y. Leung, E. P. M. Grist & M. Mark Crane. 2002. Time should be considered in developmental ecotoxicity test. *Mar. Pollut. Bull.* 45:92-99.
- Young, J. S., J. M. Gurtisen, C. W. Apts & E. A. Creclius. 1979. The relationship between the copper complexing capacity of sea water and copper toxicity in shrimp zoeae. *Mar. Environ. Res.* 2:265.