

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

POSGRADO INSTITUCIONAL EN QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



ESTUDIO SOBRE INCORPORACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y ESPECIACIÓN DE ALGUNOS ELEMENTOS EN *LACTOBACILLUS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

P R E S E N T A :

IRIS LILIANA CABALLERO ARAÚZ

GUANAJUATO, GTO. JULIO DE 2006

Guanajuato, Gto., julio de 2006.

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado "**Estudio sobre incorporación, distribución y especiación de algunos elementos en *Lactobacillus***" que realizó la Q. Iris Liliana Caballero Araúz para obtener el grado de "Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Analítica" en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección de la Dra. Katarzyna Wróbel K. y el Dr. Kazimierz Wróbel Zasada.

"La Verdad os hará Libres"

Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk

Dr. Kazimierz Wróbel Zasada

Sinodales asignados como miembros del jurado para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Analítica que presenta la **Q. Iris Liliana Caballero Araúz**:

Dr. Gustavo Cruz Jiménez
Presidente

Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk
Secretario

Dr. Kazimierz Wróbel Zasada
Vocal

**<<Este trabajo de investigación fue realizado con una beca de
la Secretaría de Relaciones Exteriores otorgada por el
Gobierno de México >>**

Agradecimientos

A Dios por darme la salud y fuerzas para seguir adelante en estos meses que he estado lejos de mi familia.

A mis padres Luis Antonio Caballero S., Emelina Araúz de Caballero, a mi hermano Luis Antonio Caballero A. y a mi Abuela Clotilde Palma por todos sus consejos y apoyo.

A mis tíos Diógenes, Ricardo, Mixela, Nelva, Miriam y a todos mis primos por apoyarme.

A mí querida amiga Blanquita su esposo Gerardo y su familia por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A un amigo que aunque este muy lejos siempre me da ánimo para seguir adelante, gracias por todo T. Q. M. N. M.

A mi comité tutorial por todas sus enseñanzas, comprensión y apoyo.

A mis compañeros de Laboratorio Alma, Panchito, David, Julio, Pepe, Armando y Cres por toda su ayuda y comprensión.

A mis compañeros de Laboratorio del IIBE María Elena, Coreño, Alma Rosa, Hoty, Emilio, y en especial al Dr. J. Félix Gutiérrez por todas sus enseñanzas.

Al Postgrado Institucional en Química en especial al Dr. Mario Ávila, a Carolina y Javier.

Al todo el personal del Instituto de Investigaciones Científicas.

A mis amigos Sagrario, Verónica, Lee, Bricia, Rossy, Lupita, Esaú, Angeles, Gustavo, Roberto, Fernando, Martita, Urania, Sandra, Sra. Marta Arriola y familia.

A mis profesores, compañeros y amigos de Panamá por su apoyo.

Dedicatorias

A Dios por ser la luz en mi camino y estar a mi lado en todo momento.

A toda mi familia en especial a mis papás por ser las personas más importantes de mi vida, Mami cada día extrañaba tus besos al levantarme y al acostarme pero, el sacrificio que hicimos al separarnos ahora da sus frutos.

A una mujer excepcional la Dra. Katarzyna Wróbel K. y a su esposo el Dr. Kazimierz Wróbel Z. por todas sus enseñanzas durante el desarrollo de esta investigación, sin sus apoyos no lo hubiera logrado.

A mi gran amiga Blanquita por ser la persona que cambio radicalmente mi manera de pensar en este país, ojalá te hubiera conocido antes pero, esos meses que estuve sin conocerte me hicieron valorar tu amistad y cariño cuando te conocí.

A un gran amigo que siempre estará en mi corazón, aunque estés lejos siento tu apoyo, gracias por todo lo que has hecho por mí.

A Carolina con la que he compartido muchos buenos momentos durante estos dos años, gracias por la paciencia que me has tenido.

A Alma Hortensia y a Panchito por siempre estar a mi lado cuando los necesite, nunca cambien su forma de ser.

A mis compañeros Julio y Pepe con los que he estado desde el principio y he compartido muchos buenos y malos momentos.

Al Dr. Mario Ávila R. y familia por recibirme y apoyarme durante mi estancia en este país.

Índice General

Índice	i
Lista de Abreviaturas	iii
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Capítulo 1 Introducción	1
1. Introducción	2
1.1. Selenio	3
1.1.1. Propiedades fisicoquímicas	4
1.1.2. Usos industriales y distribución en medio ambiente	5
1.1.3. Papel biológico	7
1.1.4. Aspectos nutricionales	9
1.1.5. Incorporación de selenio en las plantas y microorganismos	12
1.1.6. Normatividad acerca de los requerimientos y niveles permisibles del selenio	15
1.2. Tendencias actuales en la metodología analítica para la determinación y/o especiación del selenio en alimentos y productos derivados	16
1.2.1. Determinación del contenido total versus especiación	17
1.2.2. Análisis del selenio en los suplementos nutricionales	19
1.2.3. Concepto de metalómica	27
1.3. Bacterias prebióticas	28
1.3.1 Efectos benéficos de <i>Lactobacillus</i>	29
Capítulo 2 Objetivos	33
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo General	34
2.2. Objetivos Específicos	34
Capítulo 3 Parte Experimental	35
3. Parte experimental	36
3.1. Instrumentos	36
3.2. Equipo y material de laboratorio	37
3.3. Reactivos y disoluciones	37
3.4. Muestras microbiológicas	41
Capítulo 4 Resultados y Discusión	42
4. Resultados y discusión	43
4.1. Estudio analítico para la obtención de microorganismos enriquecidos <i>in vivo</i> con selenio	43
4.1.1. Bacterias del grupo <i>Lactobacillus</i>	44
4.1.1.1. Estudio de las condiciones de crecimiento	44
4.1.1.2. Incorporación del selenio a biomasa	48
4.1.1.3. Estudio de biodisponibilidad del selenio en bacterias enriquecidas	51
4.1.2. Diferentes cepas de levaduras	52
4.1.2.1. Incorporación del selenio a biomasa	53
4.2. Estudio analítico de los microorganismos expuestos <i>in vivo</i> a elementos tóxicos	55
4.2.1. Posible efecto protector del selenio en bacterias expuestas a cadmio	55
4.2.2. Inducción de fitoquelatinas en las levaduras	61

Capítulo 5 Conclusiones	69
5. Conclusiones	70
6. Bibliografía	74

Lista de abreviaturas

A	Absorbancia
Ado-Se-Hcy	Adenosilselenohomocisteína
Ado-Se-Met	Adenosilselenometionina
Bo	Bonacult
Ch	Chamito
Cm	<i>Candida maltosa</i>
CRM	Material de referencia certificado
Cys	Cisteína
DDI	Ingesta diaria adecuada y segura
DRI	Ingesta dietética de referencia
DMeSeP	Ión dimetil-Se propionato
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por el sistema de electrospray
ET	Atomización electrotérmica
GC	Cromatografía de gases
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GSH	Glutathione
HEPPS	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-propanesulfónico
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IB	Ingesta basal
ICP-MS	Espectrometría de masas con ionización en plasma acoplada inductivamente
IP HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase inversa con formación de pares iónicos
IN	Ingesta normativa
Jo	Jocoque
Km	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
LA	Ablación por láser
LAB	Bacterias ácido lácticas
LC	Cromatografía de líquidos
MALDI	Ionización mediante desorción por láser, asistida por matriz química
mBrB	Monobrombimano
MDA	Malondialdehído
MM	Masa molecular
MS	Espectrometría de masas
MSA	Ácido metanesulfónico

Me-Se-Cys	Metilselenocisteína,
Me-Se-Met	Metilselenometionina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
MW	Microondas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamina
PCs	Fitoquelatinas
RDA	Recomendada ración diaria
rpm	Revoluciones por minuto
Sb	<i>Saccharomyces bayanus</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño molecular
Se-Cys	Selenocisteína
Se-Cis	Selenocistina
Se-Et	Selenoetionina
Se-Met	Selenometionina
SeO-Met	Óxido de selenometionina
SDS	Dodecilsulfato de sodio,
SFMS	Espectrometría de masas con analizados de masas en el campo electromagnético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
UFC	Unidades formadoras de colonias
Ya	Yacult
YI	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Índice de Tablas

Tabla	Leyenda	Pág.
1	Usos industriales de diferentes compuestos de selenio.	6
2	Especies del selenio de importancia biológica.	9
3	Evolución de los conceptos relacionados con ingesta recomendada de selenio a partir de los años 80 del siglo pasado. (DDI, RDA, DRI, ingesta basal y normativa en microgramos de Se por día).	16
4	Resultados de la revisión bibliográfica enfocada al análisis de selenio en suplementos nutricionales de selenio y materiales biológicos relacionados.	20
5	Microorganismos considerados como probióticos.	29
6	Estudio de las condiciones experimentales en el crecimiento de bacterias lácticas.	46
7	Procedimientos empleados para la incorporación de Se en bacterias.	48
8	Las condiciones instrumentales en la determinación de selenio por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.	50
9	Resultados de determinación de Se total en diferentes cultivos de bacterias (mg, o μg de Se por 1 gramo de biomasa liofilizada)	50
10	Resultados de determinación de la fracción "biodisponible" de selenio incorporado en las bacterias (μg de Se por 1 gramo de biomasa liofilizada, entre paréntesis se presenta el por ciento del de Se respecto la cantidad incorporada a biomasa)	52
11	Resultados de determinación de selenio total en cinco cepas de levaduras, fortalecidas con selenio <i>in vivo</i> .	54
12	Programa de elución en gradiente en la separación de fitoquelatinas (A 0.05 % HFBA; B = acetónitrilo; C = metanol).	63
13	Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestos a ión cadmio ($\mu\text{g/g}$ – microgramos de PC-2 por 1 gramo de biomasa liofilizada). La cuantificación se llevó a cabo indirectamente, en base a la señal de glutatona.	65
14	Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestos a ión AS(III) ($\mu\text{g/g}$ – microgramos de PC-2 por 1 gramo de biomasa liofilizada). La cuantificación se llevó a cabo indirectamente, en base a la señal de glutatona.	67

Índice de Figuras

Figura	Leyenda	Pág.
1	Posibles rutas metabólicas del selenio en el organismo humano, dependiendo de la forma ingerida (GS – asociación con glutatona).	11
2	Crecimiento de las bacterias de Yacult (a), Chamito (b) y Bonacult (c) en medio líquido MLC, después de 24 hrs de incubación a 37 °C.	47
3	Efecto de las diferentes concentraciones de Cd(II) en el medio de cultivo en el crecimiento de bacterias provenientes de Bonacult: Bo – control, BoCd- cultivo presencia de Cd y BoCdSe – cultivo en presencia de Cd y Se.	57
4	Efecto de crecientes concentraciones de Cd(II) en: (a) el crecimiento de bacterias y (b) reducción de MTT (—●— Bacterias expuestas a Cd(II) y —■— Bacterias expuestas a Cd(II) + Se(IV))	58
5	Efecto de la concentración de iones cadmio (—●—) y de 1 mg/L Se(IV) + Cd(II) (—■—) en la concentración de malondialdehído en cultivos de bacterias provenientes de Bonacult a 2.5 hrs desde la inoculación.	60
6	Ecuación de la reacción de monobromobimano con el grupo tiol para formar un compuesto fluorescente.	62
7	Típicos cromatogramas de extractos de <i>Yarrowia lipolytica</i> : (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg/L de Cd(II) en el medio de crecimiento. Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – estándar interno; 3 – glutatona; 4 - γ -glutamilcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.	64
8	Típicos cromatogramas de extractos de <i>Kluyveromyces marxianus</i> : a: (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg/L de Cd(II) en el medio de crecimiento; b: (—) cepa expuesta a 5 mg/L de Cd(II) en el medio de crecimiento; (---) adición de estándar (PC-2) al extracto de cepa expuesta a Cd(II). Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – estándar interno; 3 – glutatona; 4 - γ -glutamilcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.	66
9	Típicos cromatogramas de extractos de <i>Candida maltosa</i> : (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg/L de As(III) en el medio de crecimiento. Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – estándar interno; 3 – glutatona; 4 - γ -glutamilcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.	67

Capítulo 1
Introducción

1. Introducción

Los avances en las ciencias de la vida dependen en cierta manera del desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan identificar y cuantificar cada vez más pequeñas cantidades de los analitos en muestras biológicas complejas. Por otro lado, los descubrimientos en biología, bioquímica, medicina, etc. definen nuevos retos para la química analítica moderna, exigiendo los procedimientos confiables, útiles en los estudios sobre mecanismos moleculares responsables por los efectos observados en seres vivos. Uno de los tópicos actuales es conocer el papel biológico de algunos elementos, presentes en los organismos vivos a nivel de trazas. En este caso, el concepto de esencialidad y/o de toxicidad se relaciona con la biodisponibilidad de diferentes formas fisicoquímicas del elemento, sus rutas metabólicas en los organismos vivos y las posibles interacciones con biomoléculas.

El interés en estudiar los efectos biológicos del selenio incrementó a raíz de los resultados de varios estudios epidemiológicos, llevados a cabo en regiones geográficas con muy bajos niveles del selenio en medio ambiente. En estos ensayos, se ha demostrado que la deficiencia de selenio provoca efectos adversos en la salud de la población y que estos efectos pueden ser invertidos mediante adecuada suplementación con este elemento¹. Existen fuertes evidencias sobre las propiedades antioxidantes y anticancerígenas del selenio así como sobre su habilidad de disminuir la toxicidad de algunos metales (Hg, Cd, Pb entre otros)²⁻⁵. Por otro lado, el intervalo de las concentraciones de esencialidad del selenio es muy estrecho (en suero humano 80 -160 $\mu\text{g/L}$), siendo su exceso la causa de la enfermedad selenosis crónica y también de los daños al sistema nervioso⁴. Hay que señalar que, los resultados de estudios analíticos han tenido una contribución importante en el avance sobre diferentes aspectos de la bioquímica del selenio^{3,4,6,7}.

Uno de los tópicos importantes está relacionado con la búsqueda de los productos naturales, que pudieran servir como suplementos dietéticos de este elemento. Los suplementos comerciales se basan principalmente en levadura

fortalecida con Se (*Saccharomyces cerevisiae*), donde la especie mayoritaria es selenometionina (Se-Met). Las ventajas de este producto son: actividad biológica de Se-Met, su buena estabilidad y la posibilidad la evaluación cuantitativa de Se-Met⁸⁻¹². Sin embargo, después de tratamientos largos, se ha detectado una acumulación no deseada de Se-met debido a su incorporación no específica a las proteínas (siguiendo la ruta de metionina)^{7,13}.

En la búsqueda de otros productos ricos en compuestos de este elemento que fueran biológicamente activos, en este trabajo se estudia la incorporación y la biodisponibilidad del Se en las bacterias de tipo *Lactobacillus*. Así mismo, se compara la eficacia de dicha incorporación con la obtenida para diferentes cepas de levaduras.

Una vez demostrada la habilidad del *Lactobacillus* para acumular selenio del medio, estos microorganismos se emplean como un modelo biológico para estudiar posible efecto protector de selenio contra la toxicidad de algunos elementos considerados como tóxicos. En este caso, mediante diferentes técnicas analíticas, se evalúa la respuesta de bacterias y levaduras en las condiciones de exposición a iones de cadmio.

En la Introducción se resume la información actual sobre selenio y sobre la metodología analítica para su determinación/especiación en materiales biológicos.

1.1. Selenio

Selenio es un oligoelemento vital para los organismos vivos. Está involucrado en diferentes procesos biológicos, en donde dependiendo de su concentración total y forma fisicoquímica actual, puede ejercer tres papeles diferentes:

- 1 – Elemento esencial (agente antioxidante, quimiopreventivo, estimulante del sistema inmune y reproductivo)
- 2 – Antagonista de la toxicidad de los metales pesados
- 3 – Potente agente tóxico¹⁴.

En las condiciones clínicas tales como estado de déficit de selenio, estrés oxidativo, exposición laboral a los metales pesados, envejecimiento prematuro y prevención de cáncer, se recomienda la suplementación con los productos que contengan selenio en una de sus formas biológicamente activas. En estas aplicaciones es de suma importancia utilizar adecuadas dosis de suplementos, para prevenir posibles efectos tóxicos.

En esta sección se resume la información actual sobre selenio con el enfoque en los aspectos nutricionales.

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas

El selenio (Se) pertenece al grupo VI A de la Tabla Periódica de los Elementos, donde se encuentra localizado entre el azufre y el telurio. Sus propiedades físicas y químicas son intermediarias entre un metal y un no metal. Tiene un número atómico de 34 y una masa atómica de 78.96. La abundancia relativa de sus seis isótopos naturales ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se es de 0.87, 9.02, 7.58, 23.52, 49.82, y 9.19 % respectivamente.

El selenio está distribuido en la corteza terrestre con la abundancia de aproximadamente 7 x 10-5% por peso, encontrándose en forma de seleniuros de elementos pesados y, en menor cantidad, como elemento libre en asociación con azufre elemental. Sus minerales no se encuentran en suficiente cantidad para tener utilidad, como fuente comercial del elemento, y por ello los minerales de sulfuro de cobre seleníferos son los que representan la fuente primaria.

El selenio arde en el aire con una flama azul para dar dióxido de selenio, SeO_2 . El elemento también reacciona directamente con diversos metales y no metales, entre ellos el hidrógeno y los halógenos. Los ácidos no oxidantes, no reaccionan con el selenio; pero el ácido nítrico, el ácido sulfúrico concentrado y los hidróxidos alcalinos fuertes lo disuelven.

El selenio forma compuestos en sus cuatro relativamente estables estados de oxidación: Se^{+6} (SeO_4^{2-}), Se^{+4} (SeO_3^{2-}), Se^{+2} (SeO) y Se^{-2} (seleniuros y compuestos orgánicos). El único compuesto importante del selenio con hidrógeno

es el seleniuro de hidrógeno, H_2Se , gas venenoso incoloro e inflamable con un olor desagradable, gran toxicidad y estabilidad térmica menor que la del sulfuro de hidrógeno. Disuelto en agua, el seleniuro de hidrógeno puede precipitar muchos iones de metales pesados como seleniuros muy poco solubles. Los compuestos orgánicos con enlaces covalentes C-Se son muchos e incluyen desde simples selenoles, $RSeH$; ácido selenénico, $RSeOH$; haluros organil selénicos, $RSeX$; seleniuros diorganilicos y diseleniuros, R_2Se y R_2Se_2 , hasta moléculas que exhiben actividad biológica, como los selenoaminoácidos y los selenopéptidos. Es relevante que, debido a las similitudes entre las propiedades fisicoquímicas del selenio y azufre, estos dos elementos se acompañan en la naturaleza. En particular, los organismos vivos (las plantas, microorganismos y animales) pueden incorporar los dos elementos de manera similar. Por ejemplo, la selenometionina puede reemplazar la metionina en las proteínas de manera no específica¹⁵.

1.1. 2. Usos industriales y distribución en medio ambiente

La presencia del selenio en el medio ambiente se debe a su liberación a través de procesos naturales y a descargas relacionadas con diversas actividades humanas. Así, los procesos de erosión de las rocas y actividad volcánica pueden movilizar el selenio hacia suelos y agua, de donde el elemento es incorporado por las plantas y animales hasta llegar al organismo del hombre. Los procesos industriales, que involucran el uso de selenio se presentan en la Tabla 1. Cabe resaltar que, las descargas al aire ocurren durante la combustión de carbón y los productos derivados del petróleo, formando principalmente dióxido de selenio que origina los compuestos solubles.

Los compuestos poco solubles del selenio obviamente presentan baja movilidad y biodisponibilidad, sin embargo las actividades antropogénicas que provocan un aumento de potencial redox y de alcalinidad del suelo/aguas contribuyen también en mayor movilidad del selenio en el medio ambiente. Entre otros parámetros importantes hay que mencionar la actividad microbiana, el

contenido de materia orgánica, la temperatura y la humedad en diferentes compartimientos del medio ambiente.

Tabla 1. Usos industriales de diferentes compuestos de selenio.

Compuesto	Usos
Selenio elemental	Baterías solares, celdas fotoeléctricas, xerografía, aditivo de acero inoxidable
Se_2SO_4 , Se_2SO_3	Insecticidas, uso veterinario, decoloración de vidrios, aditivo de fertilizantes de suelos.
Dietilditiocarbamato de selenio	Fungicida
SeS_2	Fabricación de semiconductores, agentes veterinarios y shampoos
SeS	Medicamentos veterinarios dermatológicos
SeF_8	Fabricación de aisladores eléctricos
CuSeO_4	Aleaciones de cobre
WSe_2	Lubricantes
Al_2Se_3 , Bi_2Se_3 , CuSe , InSe	Semiconductores
$(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$, As_2Se	Manufactura de vidrio rojo
CdSe	Fotoconductores, semiconductores, celdas fotoeléctricas, baterías solares

La distribución del selenio en el medio ambiente no es uniforme. Algunas regiones geográficas (Irán, Nueva Zelanda, Reino Unido, Finlandia, etc.) presentan muy bajos niveles de este elemento y en consecuencia baja ingesta de elemento en la población (del orden de 10-20 μg por día)^{16,17}. Por otro lado, algunas provincias de China, Colombia, región de Irapuato (México), entre otros, debido a sus suelos seleníferos, representan riesgo de intoxicaciones para los seres vivos de la región¹⁸.

Los niveles de Se en el aire son de unos pocos ng/m^3 . La mayoría del selenio atmosférico es en forma de partículas, con una menor contribución de alquilcompuestos volátiles, emitidos por plantas y bacterias. Una fuente adicional de Se en el aire, la cual puede ser importante, es el humo del cigarrillo, donde se han encontrado niveles de 0.001 a 0.063 μg por cigarrillo. En aguas superficiales, los niveles de Se son generalmente bajos (<10 $\mu\text{g}/\text{L}$), pero dependiendo de factores geológicos, ambientales y antropogénicos pueden encontrarse concentraciones mucho más altas (hasta 6 mg/L). El aumento de acidez de los

suelos reduce la movilidad del selenio debido a la formación de selenitos insolubles (por ejemplo selenito férrico), mientras que el ambiente alcalino favorece formación de selenatos, generalmente de mayor solubilidad.

1.1.3. Papel biológico

Los primeros reportes sobre los efectos de selenio en organismos vivos fueron relacionados con su toxicidad. Malformaciones del cuerpo en niños y animales domésticos, pérdida de pelo y uñas observados en China por Marco Polo en siglo XIII y por Stein en siglo XVI, e independientemente en la región de Irapuato por Juan Roca (siglo XVIII) fueron posteriormente atribuidos a dicha toxicidad¹⁸. Hoy en día se sabe que, el mecanismo de toxicidad de selenio se relaciona con su afinidad a grupos sulfidrilos presentes en varias biomoléculas. A largo plazo, la sobredosis del selenio provoca la enfermedad llamada selenosis crónica, que se manifiesta en daños al sistema nervioso, cambios en el tejido cartilaginoso, en el hígado, riñones, etc¹⁵.

La esencialidad de selenio ha sido reportada en los años 50 del siglo pasado por Schwarz y col.¹⁹. Desde entonces, se han realizado un gran número de estudios que permitieron avanzar en el conocimiento de mecanismos de acción de este elemento en sistemas biológicos. Entre otros, en regiones geográficas con muy bajos niveles del selenio en el medio ambiente, se llevaron a cabo los estudios epidemiológicos. En estos ensayos se demostró que la deficiencia de selenio involucra una mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades. Consecuentemente, el bajo nivel de selenio en el organismo humano es considerado como un factor etiológico importante en el desarrollo de cáncer, de enfermedades cardiovasculares y de tiroides, infecciones virales (polivirus, hepatitis, influenza o VIH), alteraciones del sistema reproductivo en hombres y del sistema inmune, diabetes, entre otros⁴. En los estudios epidemiológicos se observó también que, los efectos adversos en la salud pueden ser invertidos mediante adecuada suplementación con este elemento¹. En concreto, después de la suplementación con levadura de pan fortalecida con selenio (en forma de

selenometionina), la incidencia de cáncer de próstata, colon y pulmón disminuyó^{2,3,7,20}. En un estudio con ratas se mostró que el proceso carcinogénico puede ser prevenido con la suplementación por Se durante la fase de promoción y progresión²¹. Otro aspecto benéfico del selenio en organismos vivos es su carácter protector contra la toxicidad de algunos elementos tóxicos (As, Cd, Hg, etc.)^{14,22}.

En la actualidad se conoce que, los efectos del selenio en un sistema biológico dependen de su concentración total y de su distribución entre diferentes formas fisicoquímicas. Es importante resaltar que, el selenio ejerce sus efectos benéficos en un estrecho rango de concentraciones (por ejemplo los niveles normales de Se total en suero humano se consideran en un intervalo de 80 hasta 160 µg/L)²³. En cuanto a las formas fisicoquímicas se demostró que, la actividad biológica del selenio se basa en aproximadamente 30 compuestos diferentes, incluyendo selenoproteínas²⁴⁻²⁶. Así, la selenocisteína es el amino ácido proteínico número 21, formando el centro activo de importantes enzimas de los grupos de glutatona peroxidasa, yodotironina deiodinasa y tioredoxina reductasa^{4,27,28}.

La importancia de las enzimas del grupo glutatona peroxidasa se debe a su participación en la desactivación de especies oxígeno reactivas (en concreto peróxido de hidrógeno y peróxidos de lípidos). Las selenoproteínas del grupo yodotironina deiodinasa (ID I, II y III) regulan la conversión de tiroxina (T4) a 3, 5 - triyodotironina (T4) la hormona tiroidea activa o la hormona triyodotironina reversible (rT3) y la hormona tiroidea inactiva. La selenoproteína W es necesaria para la función muscular, la selenoproteína P se encuentra en el plasma con células endoteliales para protegerlas contra el daño oxidativo²⁹. Otros compuestos de selenio de relevancia biológica se presentan en la Tabla 2, indicando la importancia de cada uno y en los sistemas biológicos estudiados.

Tabla 2. Especies del selenio de importancia biológica.

Especie	Importancia biológica	Típicos materiales analizados
Formas inorgánicas: Se(IV) (selenito) y Se(VI) (selenato)	Movilidad, biodisponibilidad, efectos tóxicos	Muestras medio ambientales (aguas, suelos, sedimentos)
Mono- y dimetilseleniuro (MMSe; DMSe)	Mecanismos de biotransformación del Se en microorganismos y plantas, fitorremediación	Aire, "head-space" de los cultivos en sistemas cerrados.
Ion trimetilselenio (TMSe)	Metabolismo de Se en animales	Orina
Selenometionina (Se-Met)	Metabolismo del selenio en organismos vivos, prevención de cáncer	Órganos, tejidos y extractos de plantas y animales
Metil-selenometionina (Me-Se-Met)	Metabolismo del selenio en plantas (resistencia)	Microorganismos, plantas
Selenocisteína (Se-Cys)	Mecanismos de esencialidad a nivel molecular	Microorganismos, plantas, animales, muestras clínicas
Metil-Selenocisteína (Me-Se-Cys)	Mecanismos de quimiopreención	Microorganismos, plantas, animales, muestras clínicas
Selenohomocisteína (Se-Hcy)	Metabolismo de Se en organismos vivos	Muestras biológicas y clínicas
Selenoetionina (Se-Et)	Uso como estándar interno	Muestras biológicas y clínicas
Adenosilselenometionina (Ado-Se-Met)	Papel del Se en procesos de biometilación	Extractos de microorganismos, tejidos y órganos de animales
Adenosilselenohomocisteína (Ado-Se-Hcy)	Papel del Se en procesos de biometilación	Extractos de microorganismos, tejidos y órganos de animales
γ -glutamyl-metilselenocisteína	Mecanismos de quimiopreención	Microorganismos, plantas, animales, muestras clínicas
Selenoazúcares (N-acetilselenohexosaminas)	Metabolismo de Se en organismos vivos	Extractos de plantas, tejidos y órganos de animales, orina
Selenoproteínas (glutaciona peroxidasa, yodotironina deyodinasa, tioredoxina reductasa, proteína P, proteína W, etc.)	Mecanismos de esencialidad a nivel molecular	Muestras clínicas

1.1.4. Aspectos nutricionales

Las principales fuentes de selenio para el hombre son el agua potable y los alimentos. La absorción en el tracto digestivo, retención y utilización del selenio en cuerpo están estrictamente relacionadas con la forma fisicoquímica ingerida. Para garantizar una ingesta adecuada y prevenir posibles intoxicaciones, es necesario entonces caracterizar los compuestos del selenio en alimentos y bebidas, conocer su estabilidad en cada producto, su biodisponibilidad y farmacocinética en el organismo humano. En este contexto, los productos de interés incluyen los alimentos naturalmente ricos en selenio (nueces de Brasil, cereales y legumbres, pescado, carnes rojas, las vísceras y los productos de origen animal) y los suplementos dietéticos^{30,31}.

En la dieta natural típica, la forma mayoritaria del selenio es selenometionina incorporada de manera no específica a las proteínas (productos de origen de plantas y de animales)^{32,33}. Las formas inorgánicas presentan una contribución mucho menor, especialmente en los alimentos no fortificados. La ingesta de selenoproteínas es mínima y se relaciona con el consumo de alimentos de origen animal. Recientemente, Gammelgaard y col. analizaron los resultados de los estudios sobre metabolismo y excreción del selenio y propusieron un esquema de posibles rutas metabólicas, presentado en la Fig 1³³⁻³⁵. En esta Figura se puede observar que, al entrar en el organismo, todas formas del selenio (Se-Met, Se(IV), selenoproteínas) son reducidas para formar un almacén común de selenio (H_2Se). A partir de esta forma se puede llevar a cabo la síntesis de selenocisteína y su incorporación específica a las selenoproteínas^{24,36}. Alternativamente, el exceso de selenio puede ser eliminado vía orina en forma del ion trimetilselenio y/o como selenoazúcares. Es importante señalar que, la selenometionina puede ser incorporada directamente (sin su reducción a H_2Se) a las proteínas. Sin embargo, este proceso no es específico, ya que ocurre mediante simple sustitución de metionina por su análogo de selenio. El esquema presentado en la Fig. 1 sugiere, que la forma del selenio ingerida no tiene importancia en la incorporación de Se a selenoproteínas. Sin embargo, hay que

tomar en cuenta la alta reactividad química y diferente biodisponibilidad de las especies inorgánicas respecto a las formas orgánicas. En particular, el proceso de reducción de Se(IV) en el organismo involucra participación de glutatona, lo que puede provocar el estado de estrés oxidativo^{37,38}. De hecho, existen evidencias de la toxicidad y de carácter mutagénico de las formas inorgánicas del selenio^{17,39}. Resumiendo, existe un consenso que, el selenio debería ser ingerido preferentemente en forma de compuestos orgánicos que, además de ser más biodisponibles, presentan relativamente baja reactividad respecto a los compuestos inorgánicos^{24,40,41}. Cabe señalar que, la ingesta de excesivas cantidades de Se-Met puede provocar efectos tóxicos, debido a su incorporación no-específica a las proteínas^{42,43}.

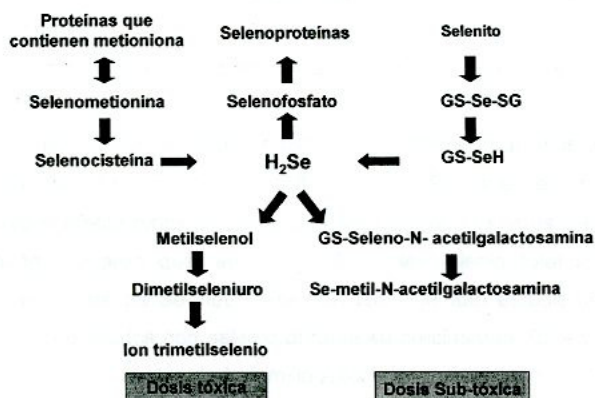


Figura 1. Posibles rutas metabólicas del selenio en el organismo humano, dependiendo de la forma ingerida (GS – asociación con glutatona)⁴⁴.

En búsqueda de los compuestos responsables por propiedades anticancerígenas del selenio, en varios sistemas experimentales se estudió la actividad biológica de diferentes especies^{2,3,13}. Los resultados obtenidos demostraron que la especie de mayor actividad contra tumores es

metilselenocisteína, seguida por selenito y selenocisteína¹³. En el estudio más reciente, se incluyeron diferentes alk(en)ilselenocisteínas y sus γ -glutamyl derivados, observándose de nuevo la mayor actividad de metilselenocisteína⁴⁵. Cabe mencionar también los estudios sobre la factibilidad del uso de compuestos sintéticos (por ejemplo [1,4-fenilselenilenebis(metilene)selenocianato])^{46,47}.

En base en los estudios que se acaban de presentar, está claro que un producto alimenticio, o un suplemento de selenio debería cumplir con los siguientes requisitos:

- la forma mayoritaria del selenio presenta actividad biológica,
- el compuesto activo del selenio es estable bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento del producto (metilselenoaminoácidos se descomponen fácilmente formando compuestos volátiles)¹⁷,
- se cuenta con la información cuantitativa sobre las especies del Se presentes,
- la presencia del selenio no afecta la calidad de alimentos (específicamente el color y olor).

En cuanto a los productos naturales, los más altos niveles de selenio total se encontraron en nueces de Brasil (8-35 $\mu\text{g/g}$)⁴⁸. En los experimentos con ratas, se observó el efecto protector de estas nueces contra tumores⁴⁹. Los estudios de especiación indicaron que, aprox. el 75 % del selenio total en nueces está presente en forma de Se-Met¹¹. Por otro lado, se han estudiado los productos naturales, enriquecidos con selenio durante su crecimiento. En este contexto hay que mencionar las plantas de la familia *Allium*, encontrándose diferentes especies de selenio, de los cuales Me-Se-Cys y γ -glutamyl-metilselenocisteína fueron las más importantes debido a su actividad quimiopreventiva^{2,7,15,50,51}. Actualmente, la gran mayoría de los suplementos comerciales contiene levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) enriquecida, donde la forma mayoritaria del Se es la Se-Met (hasta 70 % del contenido total)^{10,11,52}.

1.1.5. Incorporación de selenio en las plantas y microorganismos

Cuando el proceso de incorporación del selenio se relaciona con el posible uso del producto obtenido en la suplementación del hombre, la eficacia de dicha incorporación es muy importante. Con el fin de obtener altas concentraciones de Se, en primer lugar se ha estudiado la tolerancia de diferentes especies biológicas a diferentes concentraciones y formas del selenio presentes en el medio de crecimiento, evaluando en cada uno de los casos el contenido total del selenio en biomasa. En uno de los primeros reportes, se obtuvo el ajo fortalecido agregando sales de selenio (Se(VI) y Se(IV)) al fertilizante del suelo⁵⁰. Utilizando similares condiciones de cultivo (mezcla de musgo de turba y vermiculita como sustrato sólido), se comparó la incorporación de Se en ajo y en cebolla observándose mayor eficacia de incorporación en ajo (28 µg de Se por gramo de biomasa seca en cebolla versus 110 - 150 µg/g en ajo)⁵¹. Whanger y col. compararon la incorporación del selenio en bulbos de una especie de cebolla (puerro silvestre), cultivada en condiciones hidropónicas y en medio sólido (musgo de turba)². En este estudio se utilizaron diferentes concentraciones del selenito de sodio (hasta 300 mg de Se por kilogramo de medio sólido y hasta 120 mg de Se por litro de medio líquido), sin observar la inhibición significativa del crecimiento de la planta. Por otro lado, la incorporación del Se en planta cultivada en medio líquido fue más eficaz². Lintschinger y col. usaron la solución de selenato de sodio (Se(VI)) para incorporar selenio en granos de trigo, alfalfa (*Medicago sativa*) y girasol (*Helianthus annuus*) durante etapa de germinación⁵³.

Se estudió también el proceso de incorporación de selenio en hojas de cebolla (*Allium cepa* L.) cultivada en condiciones hidropónicas, en presencia de selenato, o selenito de sodio⁵⁴. En primer lugar, se observó una inhibición del crecimiento en presencia de cada una de las formas de selenio (5 mg/L de Se como Se(IV) o Se(VI) en el medio de crecimiento), siendo el efecto más marcado en presencia de selenito. En la determinación de selenio total por ICP-MS, se observó la incorporación más eficaz del elemento en hojas respecto a bulbos. Además, se encontró mayor concentración de selenio en hojas de plantas

crecidas en la presencia de selenito (600 mg/kg) respecto a hojas de las plantas cultivadas con selenato (155 mg/kg). Se obtuvieron extractos alcalinos de hojas, los cuales se analizaron mediante SEC con detección espectrofotométrica (280 nm) y por ICP-MS (^{77}Se). Los resultados obtenidos revelaron la incorporación de selenio a los compuestos de alta masa molecular ($\text{MM} > 10 \text{ kDa}$). En concreto, aproximadamente el 33 % de selenio total en la biomasa fue encontrado en la fracción de alta MM del extracto de hojas con selenito, mientras que el extracto de hojas cultivadas en presencia de Se (VI) incorporó en sus proteínas solamente 3 % del selenio total encontrado en biomasa. En el estudio posterior, el proceso de incorporación del Se fue investigado en la planta llamada cebollín (*Allium fistulosum*), la cual se caracteriza por una gran cantidad de hojas verdes⁵⁵. El cultivo de cebollín se llevó a cabo en sustrato sólido, utilizando celdas comerciales (mezcla de "sphagnum", musgo de turba, perlita, vermiculita, dolomita y piedra caliza) en invernáculo (16-21 °C) y con riego diario. Después de dos meses, a las celdas se les agregó selenito de sodio a diferentes concentraciones (1 - 15 mg Se por kilogramo de sustrato sólido) y, pasados otros cuatro meses, las plantas se cosecharon. En estas condiciones de crecimiento, no se observó ninguna inhibición del crecimiento en presencia de selenito. El contenido total del elemento en la biomasa fue proporcional a la concentración de selenito en el medio de crecimiento, pero generalmente los niveles de Se en hojas fueron inferiores a los observados en condiciones hidropónicas de cultivo (30.3 mg/kg en hojas obtenidas en celdas conteniendo 15 mg/kg de selenio en sustrato sólido). El análisis mediante SEC - ICP-MS de los extractos alcalinos de hojas reveló la incorporación de selenio a proteínas ($\text{MM} > 10 \text{ kDa}$), de manera similar como en extractos de la cepa *Allium*.

Debido al amplio uso de levadura enriquecida como fuente dietética del selenio, varios autores estudiaron el proceso de su incorporación en estos microorganismos. Como ejemplo, Ponce de Leon y col. examinaron cuatro diferentes procedimientos, en los que el selenio se agregó en diferentes etapas de crecimiento de *Saccharomyces c.*, utilizando selenito de sodio a diferentes concentraciones¹⁰. Adicionalmente, para evaluar el efecto de procesos de

fermentación, se probaron dos medios de crecimiento: uno con glucosa como fuente de carbon y otro con glicerol. Los resultados analíticos indicaron que, la incorporación fue más eficiente al utilizar bajas concentraciones de selenito agregadas en la etapa de crecimiento de los microorganismos. Para estudiar la farmacocinética del Se ingerido con levadura enriquecida, se obtuvo el cultivo enriquecido con el isótopo $^{77}\text{Se}^{56}$. En este caso, el selenito de sodio marcado con ^{77}Se fue agregado gradualmente al medio de crecimiento líquido durante 18 horas. La biomasa liofilizada contenía $1380 \pm 10 \mu\text{g/g}$ de ^{77}Se .

1.1.6. Normatividad acerca de los requerimientos y niveles permisibles del selenio

El progreso en bioquímica de selenio se ha reflejado en los valores considerados como benéficos y/o adversos para la salud del hombre. En la Tabla 3 se puede observar como han evaluado las recomendaciones nutricionales desde los años 80 del siglo pasado⁵⁷. Los primeros valores propuestos se definieron como "ingesta diaria adecuada y segura" (DDI – safe and adequate Daily Dietary Index). Posteriormente, en el año 1989 se introdujo el concepto de "recomendada ración diaria" (RDA – Recommended Dietary Allowance). En el año 1996, la Organización Mundial de la Salud (WHO – World Health Organization) estableció los requerimientos basales y normativos. El requerimiento basal se evaluó en base a la mínima cantidad necesaria para proteger contra la enfermedad de Keshan (enfermedad cardiovascular endémica de la provincia Keshan en China, donde se presentan muy bajos niveles del Se). Actualmente, se maneja el término de "ingesta dietética de referencia" (DRI, Dietary Reference Intake), que recomienda la ingesta de $70\mu\text{g/día}$ para los hombres y $55\mu\text{g/día}$ para las mujeres.

Cabe mencionar las propuestas basadas en los aspectos preventivos, donde se extienden las necesidades de selenio entre 250 y 300 microgramos al día, cifra que no resulta alarmante, toda vez que en pueblos asiáticos, apegados por tradición al consumo de pescado, llegan a tomar hasta 500 microgramos sin

ninguna reacción adversa. La Secretaría de Salud en Reino Unido reporta la ingesta diaria de 750 – 900 µg de selenio como tóxica, indicando como la máxima ingesta segura el valor de 450 µg por día para hombres adultos¹⁷.

Tabla 3 Evolución de los conceptos relacionados con ingesta recomendada de selenio a partir de los años 80 del siglo pasado⁵⁷. (DDI, RDA, DRI, ingesta basal y normativa en microgramos de Se por día)

Etapas de la vida	Edad (años)	DDI 1980	RDA 1989	WHO, 1996		DRI 2000
				IB	IN	
Infantes	0-1	10-60	10-15	3-6	6-12	15-20
Niños	1-3	20-80	20	10	20	20
	4-6	30-120	20	12	24	30
	7-10	50-200	30	14	25	30-40
	11-14	50-200	40	16-19	30-36	40-55
Hombres	> 15	50-200	70	21	40	40-55
Mujeres	> 15	50-200	55	16	30	55
Embarazadas	-	65	18	39	60	
Lactancia:	-	-	75	-	-	70
0-3 meses	-	-	21	42	-	-
3-6 meses	-	-	-	25	46	-
6-12 meses	-	-	-	26	52	-

DDI - ingesta diaria adecuada y segura (safe and adequate Daily Dietary Index);

RDA - recomendada ración diaria (Recommended Dietary Allowance);

IB - ingesta basal

IN - ingesta normativa

DRI - ingesta dietética de referencia (Dietary Reference Intake)

1. 2. Tendencias actuales en la metodología analítica para la determinación y/o especiación del selenio en alimentos y productos derivados

La información cuantitativa sobre el contenido total del selenio en muestras biológicas es útil, ya que ayuda a caracterizar el sistema estudiado, evaluar su posible valor nutricional (o riesgo de efectos adversos, relacionado con altos valores), estudiar la eficacia de incorporación del selenio, etc. Por otro lado, es la forma fisicoquímica del elemento la que decide sobre su movilidad, biodisponibilidad, retención en los organismos vivos y sobre su específica función

biológica. Así que, el interés científico se ha ido expandiendo hacia el análisis de especiación. Cabe aclarar que, la IUPAC refiere el término "especie" a una estructura molecular, electrónica y/o nuclear única y bien definida. Así mismo, el término "análisis de especiación" se define como medición de la cantidad de una o más especies presentes en la muestra⁵⁸.

1. 2.1. Determinación del contenido total versus especiación

La determinación del contenido total, especialmente en las muestras sólidas y/o líquidas de matriz química compleja, requiere de un tratamiento previo, cuyo objetivo es convertir la muestra en una solución relativamente simple. Para ello, pueden aplicarse diferentes tipos de ataques por vía seca y/o húmeda. Entre las técnicas analíticas típicamente utilizadas para la determinación de selenio se encuentran espectrometría de absorción atómica con horno de grafito, espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma acoplado inductivamente, ICP-MS⁵⁹⁻⁶¹. En muchas aplicaciones, la introducción de muestra es mediante el sistema de generación de hidruros para garantizar mejor sensibilidad y para evitar posibles interferencias de matriz⁶²⁻⁶⁴. Alternativamente, el selenio puede ser cuantificado por el análisis de activación por neutrones^{65,66}, por métodos electroquímicos, por espectrofotometría y/o espectrofluorimetría. En los últimos dos casos, la derivatización con 2,3-diaminonaftaleno permite aumentar de manera sustantiva la sensibilidad de la determinación⁶⁷.

Un típico diseño en el procedimiento de especiación se basa en las siguientes etapas: (1) pretratamiento de muestra; (2) fraccionamiento/separación de las especies y (3) cuantificación del elemento de interés en las fracciones obtenidas. La etapa de pretratamiento tiene que ser diseñada cuidadosamente para prevenir posibles pérdidas y/o inter-conversiones entre las especies. Para materiales biológicos, el tratamiento involucra la homogenización, secado o liofilización, seguidas por extracción/lixivación de especies de interés. Se emplean también los procedimientos para separar proteínas, lípidos, poliazúcares u otro tipo de moléculas de interés, que pueden ser finalmente hidrolizadas

liberando especies del selenio de baja masa molecular^{11,54,55,61,68-73}. Como ejemplo, para solubilizar proteínas solubles en agua y los compuestos de baja masa molecular, solubles y no asociados con proteínas, se llevó a cabo la extracción de levadura fortificada con agua caliente^{74,75}. La digestión ácida y/o enzimática de las mismas muestras permitió liberar selenoaminoácidos enlazados covalentemente (acerca de 90 % del selenio total)^{9-11,52,76}.

Cuando el objetivo de análisis es caracterizar las especies desconocidas (o no esperadas en la muestra), estudiar los procesos de incorporación o rutas metabólicas del elemento en un organismo vivo, el diseño de etapa de pretratamiento es todavía más importante. Se lleva a cabo entonces la separación macroscópica de órganos y/o tejidos, aislamiento de ciertos tipos de células, rompimiento de las paredes celulares, fraccionamiento sub-celular y finalmente el aislamiento de biomoléculas específicas^{11,68,77}. Como ejemplos representativos se pueden mencionar los estudios sobre la incorporación del selenio en los macrohongos comestibles⁷⁸, sobre su distribución en nueces⁶⁸ y sobre su posible papel en procesos de biometilación en *Saccharomyces c*⁷⁹.

En la etapa de separación de especies no volátiles de selenio, hoy en día existe clara tendencia para utilizar cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La técnica SEC permite estudiar la asociación del elemento con fracciones de diferente tamaño molecular Se^{54,55,72}. Las columnas de intercambio aniónico fueron utilizadas en la separación de formas inorgánicas (Se(IV) y Se(VI)), y/o selenometionina, selenocisteína, metilselenocisteína y ion trimetilselenio en extractos de plantas y levadura^{61,80,81}. Por otro lado, muchas de las especies de Se (selenoaminoácidos y péptidos, ion trimetilselenio, adenosilselenometionina) tienen carga eléctrica positiva, o pueden ser fácilmente convertidos en cationes mediante el aumento de acidez de la solución. Por lo tanto, en muchos estudios estas especies fueron separadas en columnas de intercambio catiónico. Así, utilizando la fase móvil a pH 2 – 5.7 (piridina o formato de amonio) se obtuvo la separación de hasta diez compuestos: metilselenocisteína, alquilselenocisteína, propilselenocisteína, selenometionina, selenoetionina, selenocisteína, ácido dimetilseloniopropiónico,

selenohomocisteína, ion trimetilselenio y metilselenometionina⁸²⁻⁸⁴. La tercera técnica LC, tal vez de mayor uso en el análisis de alimentos y productos relacionados es la cromatografía en fase inversa formando pares iónicos (IP HPLC)^{48,85}. Típicos reactivos empleados como contra iones han sido diferentes ácidos carboxílicos perfluorinados (por ejemplo heptafluorobutírico)^{81,86} y ácidos alquilsulfónicos (por ejemplo el ácido hexanesulfónico), obteniéndose una buena resolución cromatográfica en el análisis de extractos de nueces, verduras de la familia *Allium* y levadura^{11,54,68,69}.

En la etapa de detección, el efluente de la columna o las fracciones separadas son analizadas por una de las técnicas de espectrometría atómica antes mencionadas. Debido a que, estas técnicas proporcionan la información sobre el contenido total, la identificación de los compuestos se basa en el uso de estándares comerciales (comparación de los tiempos de retención y método de adición de estándar). Cuando en la muestra analizada se presentan especies, para los cuales no existen estándares, ninguna de las técnicas de espectrometría atómica permite identificación. En estos casos, es necesario llevar a cabo el análisis estructural, que requiere alta pureza del compuesto. En este contexto, es necesario mencionar el uso secuencial de diferentes técnicas cromatográficas y/o electroforéticas (separaciones ortogonales, o multidimensionales), específicamente en el análisis de levadura y de extractos de plantas^{72,87-91}. El esquema consiste en la separación SEC, colección de las fracciones de la columna, su preconcentración e introducción a la columna de fase inversa y/o intercambio iónico. Para separación de proteínas y péptidos, se utiliza electroforesis en geles^{92,93}. Como resultado, se obtienen los compuestos de selenio de alta pureza, que pueden ser caracterizados estructuralmente mediante las técnicas de espectrometría de masas^{89-91,94}.

1. 2. 2. Análisis del selenio en los suplementos nutricionales

Los resultados de estudios de especiación de selenio en suplementos nutricionales se presentan de manera resumida en la Tabla 4. Estos productos

incluyen levadura y verduras fortalecidas con selenio y también las nueces de Brasil, naturalmente ricas en selenio.

Tabla 4. Resultados de la revisión bibliográfica enfocada al análisis de selenio en suplementos nutricionales de selenio y materiales biológicos relacionados.

Muestra	Pretratamiento y/o fraccionamiento	Metodología analítica	Resultados analíticos	Ref
Ajo 1355 µg/g Se	Extracción con agua caliente, o con MeOH - 0.2 M HCl (1:9)	IP HPLC-UV-ICP-MS (254 nm, ⁸² Se)	Especie primaria: Me-Se-Cys Cantidades inferiores de Se inorgánico, Se-Met Y especies no identificadas.	81, 95
Ajo 235 µg/g Se			La especie mayoritaria sin identificar, detección de Se inorgánico, MeSe-Cys y Se-Met.	
Ajo 68-1355 µg/g Se	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV)	IP HPLC-ICP-MS (⁸² Se) IP HPLC-ESI-MS	Recuperación de Se en el procedimiento: 68-95 % Especies primarias: γ-glutamyl Me-Se-Cys a bajas concentraciones de Se incorporado y Me-Se-Met a altas concentraciones.	3, 9
Ajo 296 µg/g Se	Extracción con agua caliente	IP HPLC-ICP-MS (⁸² Se) IP HPLC-ESI-MS	Especie primaria: γ-glutamyl Me-Se-Cys (90 % del Se total).	75
Cebolla 96, 140 µg/g Se	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV)	IP HPLC-ICP-MS (⁸² Se) IP HPLC-ESI-MS	Recuperación del Se en el procedimiento: 92-96 % Especie primaria: γ-glutamyl Me-Se-Cys. Se encontraron también: Se inorgánico, Se-Cys, Se-cistationina, MeSe-Cys y Se-Met.	9

Hojas de cebolla 154-601 µg/g y bulbos 16-51 µg/g Se	Extracción de proteínas con 0.1 M NaOH; Extracción de la fracción de baja MM: 1) MeOH-CHCl ₃ -H ₂ O (12:5:3) 2) 0.4 M HClO ₄ : 80% EtOH	SEC-UV-ICP-MS (280 nm, ⁸² Se) IP HPLC-ICP-MS	El contenido de Me-Se-Cys en extractos de hojas fue 4.0 % y 1.9 % del selenio total respectivamente en plantas cultivadas en presencia de Se(IV) y Se(VI).	54
Hojas de cebollín 1-30 µg/g Se	Extracción de proteínas con 0.1 M NaOH; Extracción de Se no asociado con proteínas con 0.1 M HCl; hidrólisis enzimática (proteínasa K, proteasa XIV)	SEC-UV-ICP-MS (280 nm, ⁸² Se) IP HPLC-ICP-MS ESI-MS (trampa iónica) ESI-MS-MS	Aprox 44 % del Se total encontrado en forma de compuestos de MM > 10 kDa; la especies primarias en el extracto de HCl fueron γ-glutamyl Me-Se-Cys y MeSe-Cys (también se detectó Se-Met). En el extracto enzimático se encontraron Se-Met y Se-Cys.	55
Brócoli 876 µg/g Se	Se examinaron 27 diferentes condiciones de extracción	HPLC-ICP-MS	Se demostró que, las pérdidas y/o inter-conversiones de las especies dependen fuertemente de las condiciones de extracción.	96
Levadura 1922 µg/g Se	Extracción con agua caliente	IP HPLC-ICP-MS	Especie primaria: Se-Met Bajos contenidos de Se inorgánico, Se-Cys, Me-Se-Cys Presencia de especies no-identificadas.	81
Levadura 1.2-2.1 mg/g Se	Extracción con agua caliente	IP HPLC-ICP-MS (⁸² Se) IP HPLC-ESI-MS ESI-MS	La recuperación de aprox 10 % del Se total, como la especie primaria se encontró Se-Met El empleo de ESI-MS permitió identificar ADoSe-Met.	3, 9, 74, 97
	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV)		Recuperación del procedimiento: 67-93 %; especie primaria Se-Met (60-85 %); se detectaron bajas concentraciones de Se inorgánico, Se-Cis, Se-Lationina, Se-Cystationina y Me-Se-Cys.	

Levadura 1922 µg/g Se , Suplemento commercial 400 µg/g Se	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV)	IP HPLC-ICP- MS IP HPLC-ESI- MS (⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se)	Las especies primarias identificadas como Se-Met y AdoSe-Hcy (suma de los dos 85 % del Se total encontrado).	75, 98, 99
Levadura fortalecida	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV y subtilisina) con el empleo de la sonda de ultrasonido	HPLC-ICP-MS	Se observó un incremento del rendimiento de extracción.	100
Levadura fortalecida con ⁷⁷ Se, 1390 µg/g Se	Hidrólisis enzimática (β-glucosidasa y mezcla de proteasas)	LC de intercambio catiónico, elución en gradiente, detección ICP- MS (⁷⁷ Se, ⁸⁰ Se) con celda de reacción/colisi ón	Rendimiento de extracción: 90- 95%, el método cromatográfico capaz de separar 30 compuestos de Se, 53% Se total encontrado en forma de Se-Met, se demostró la oxidación de Se-Met durante el manejo de muestra.	55
Harina de trigo y levadura (candidatos a CRM)	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV, lipasa VII)	LC de intercambio aniónico, detección ICP- MS con celda de reacción/colisi ón, análisis por dilución isotópica (⁷⁸ Se/ ⁷⁷ Se)	Resultados de análisis cuantitativo: 59% y 68% del Se total en forma de Se-Met en harina y levadura respectivamente, buena concordancia con los resultados obtenidos en otros laboratorios.	80
Levadura fortalecida con Se en el laboratorio	Homogenización y extracción con 0.4 M HClO ₄ a 0 °C	IP HPLC-ICP- MS ESI-MS	Especies mayoritarias: Se-Cis, AdoSe-Hcy Los resultados permitieron identificar Ado-Se-Met.	88

Levadura fortalecida con Se	Extracción con agua caliente	Separación SEC, seguida por LC con grafito poroso SEC 2-dimensional, detección ICP-MS, análisis ESI-MS	Identificación de selenodiglutatona (GS-Se-SG) y puentes de trisulfuro (GS-Se-SCG).	91
Suplemento comercial basado en levadura	Extracción de proteínas (5% SDS en Tris/HCl pH 8.0), desnaturalización mediante tratamiento no-reductivo con SDS, derivatización con ácido yodoacético	Electroforesis bidimensional PAGE-LA-ICP-MS (⁷⁷ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se)	Desarrollo metodológico, límite de cuantificación en LA-ICP-MS de 0.07 µg Se por gel; detección de dos proteínas conteniendo el Se asociado.	101
Levadura fortalecida con Se	Extracción con agua caliente y digestión con tripsina	SEC, LC en fase inversa, MALDI-MS (tiempo de vuelo), ESI-MS	Caracterización de péptidos y proteínas con el átomo de Se asociado.	102-104
6 lotes de suplementos comerciales, basados en levadura 91-253 µg Se por tableta	Se examinaron diferentes condiciones de extracción, seleccionando la extracción con HCl 2 M asistida por MW y/o hidrólisis enzimática con proteínasa K	IP HPLC-ICP-MS (⁸² Se)	Solamente 2 lotes presentaron apreciables concentraciones de Se-Met (hasta 130 µg Se por tableta).	52
Suplemento comercial en base a levadura	Hidrólisis enzimática, derivatización con etilcloroformato	GC en columna capilar, detección ICP-MS	Se obtuvo la cuantificación de isómeros ópticos con el límite de detección absoluto de 4 pg de Se.	105
Ajo y cebolla sin fortalecer <0.5 µg/g Se	Hidrólisis enzimática (proteasa XIV)	IP HPLC-ICP-MS (⁸² Se)	Recuperación de Se en el procedimiento: 100% Especies primarias en cebolla: Se inorgánico. Especies primarias en ajo: Se-Met, γ-glutamyl Me-Se-Cys, Me-Se-Cys.	9

Ajo cosechado en los suelos seleníferos 205 µg/g Se	Extracción con agua caliente	Separación SEC, seguida por LC en fase inversa, ICP-MS, ESI-MS	La especie primaria: γ-glutamyl Me-Se-Cys.	88
Pescado	Diferentes tipos de fraccionamiento: ultrafiltración, precipitación de proteínas con TCA	SEC-ICP-MS	Rendimiento de extracción: 23-47 %, recuperación desde la columna: 70 %; se demostró la asociación del Se con proteínas.	71
Nueces	Fraccionamiento de lípidos, proteínas y citosol, hidrólisis enzimática (proteínasa K)	SEC-ICP-MS (⁷⁸ Se) IP HPLC-ICP-MS	Se demostró la asociación del Se con proteínas mediante enlaces covalentes Se-C y RS-Se-SR' ó RS-SeCH ₃). Especies primarias: Se-Met (19-25 % del Se total en proteínas y 3-12 % en citosol), se observó incompleta liberación de Se-Met de proteínas.	88
Nueces de Brasil y levadura comercial conteniendo 1261 µg/g Se	Hidrólisis ácida (ác. metanesulfónico); hidrólisis enzimática (proteínasa K y proteasa XIV)	SEC-ICP-MS IP HPLC-ICP-MS, (⁸² Se)	Más eficiente extracción con ác. metanesulfónico. Los resultados indicaron 65 % del Se total en forma de Se-Met en levadura y 75 % en nueces (en el caso de hidrólisis enzimática estos valores fueron 46 % y 25 % respectivamente).	11, 48
Suplemento comercial (levadura) y algas 566 µg/g Se	Algas: extracción con 10 % TCA, 0°C Levadura: hidrólisis enzimática (Novozyme 234 tm y Flavourzyme 1000L tm)	LC de intercambio catiónico y aniónico, detección ICP-MS, análisis estructural por ESI-MS	Levadura: la especie mayoritaria fue Se-Met, detección de SeO-Met. Algas: DMeSeP (confirmado por ESI-MS) y especies sin identificar.	76
Granos de plantas cultivadas en suelos fertilizados con Se	Extracción con agua caliente y hidrólisis enzimática (pronasa)	LC de intercambio aniónico con detección por ICP-MS (⁸² Se)	Eficacia de extracción: 3-9 % en agua y 80-95 % en hidrólisis enzimática. Las contribuciones de Se-Met, Se-Cys y Se(VI) correspondieron respectivamente a 62-86 %, 15-22 % y 12-16 % del Se total.	106

Ado-Se-Hcy – adenosilselenohomocisteína, Ado-Se-Met – adenosilselenometionina, DMeSeP – ion dimetil-Se propionato Me-Se-Cys – metilselenocisteína, Me-Se-Met – metilselenometionina, Se-Et – selenoetionina; Se-Cys – selenocisteína; Se-Cis – selenocistina, Se-Met – selenometionina,

SeO-Met – óxido de selenometionina; CRM – material de referencia certificado; ET– atomización electrotrémica, LA – ablaci3n por laser, ESI-MS - espectrometría de masas con ionizaci3n por el sistema de electrorocíado; PAGE –electroforesis en gel de poliacrilamina, SDS – dodecilsulfato de sodio, SFMS- espectrómetro de masas con analizad3s de masas en el campo electromagnético; TCA – ácid3 tricloroacético

La gran mayoría de los suplementos comerciales se basan en la levadura fortalecida con selenio. En estos productos, la forma mayoritaria del Se es la selenometionina enlazada a proteínas, lo que asegura buena estabilidad y actividad biológica del suplemento^{1,4,43,99,107}. La especiación del selenio en levadura enriquecida fue el foco de varios estudios analíticos. Mediante la extracci3n con agua caliente, se caracterizaron los compuestos de baja masa molecular (no asociados con proteínas)^{3,9,69,74,81,97}. Para el análisis de Se enlazado en la estructura de proteínas, se utilizaron diferentes procedimientos de hidrólisis enzimática y/o ácida^{3,9,74,75,92,97,98,100,108}. En los primeros reportes, los autores observaban relativamente gran número de especies, de los cuales solamente algunos fueron identificados^{81,95,98}. El empleo de espectrometría de masas con ionizaci3n suave mediante el sistema de electrorocíado (ESI-MS) ha permitido identificar varios de estos compuestos para los cuales no se contaba con los estándares comerciales (Me-Se.Cys, Ado-Se-Hcy, Ado-Se-Met, GS-Se-SG, etc.)^{9, 69,75,91,94,97}. Cabe mencionar la importancia de desarrollo metodol3gico por cromatografía líquida, ya que los estudios de diferentes mecanismos y condiciones de separaci3n han permitido lograr buena resoluci3n, esencial en la asignaci3n de los picos cromatográficos^{76,89,109}.

Debido al consumo humano de levadura fortalecida, es de suma importancia tanto su análisis cualitativo como cuantitativo. Se ha reportado que, después del consumo prolongado de este tipo de productos, ocurre una acumulaci3n de Se no deseada en el organismo, lo que representa cierto riesgo de intoxicaci3n^{42,43}. Para controlar la forma de Se y su dosis ingerida, algunos de los estudios fueron enfocados en la determinaci3n de Se-Met. El primer reto fue lograr buen rendimiento de extracci3n de selenocompuestos de la muestra mediante el desarrollo de procedimientos de pretratamiento de muestra^{11,52,100}.

Por otro lado, hay que notar un progreso en las condiciones de detección final de Se. Como se puede observar en la Tabla 4, la técnica más utilizada en los estudios de especiación es ICP-MS, obviamente debido a su alta sensibilidad, pocas interferencias y relativamente fácil acoplamiento con la etapa de separación cromatográfica. Diferentes reportes han demostrado que, el uso de los instrumentos de alta resolución, de la tecnología de celdas de reacción/colisión junto con el análisis por dilución isotópica aseguran mejores condiciones de detección y, en consecuencia más confiables resultados de cuantificación^{80,85,110}.

Las verduras de la familia *Allium* presentan mayor actividad contra cáncer respecto a la levadura con Se, debido a la contribución de las especies Me-Se-Cys y γ -glutamyl Me-Se-Cys^{2,3,7,9,54,55,81,88,95}. Cabe mencionar que, las mismas especies fueron encontradas en las plantas fortalecidas en las condiciones de laboratorio (utilizando medios de crecimiento líquidos y sólidos) y en las plantas cosechadas en suelos seleníferos^{9,88}. Sin embargo, dependiendo de la especie biológica y del contenido total de Se, la distribución relativa de las especies es aparentemente diferente^{2,3,9,96}. Está demostrado que, las Se-alk(en)ilcisteínas y sus γ -glutamyl derivados tienen mayor actividad biológica, pero también presentan menor estabilidad respecto a Se-Met. Además, el proceso de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* es relativamente fácil, rápido y, en consecuencia económicamente atractivo. Por ello, hasta la fecha se manejan solamente los suplementos comerciales basados en levadura y no en las verduras antes mencionadas. En este contexto, parece interesante el uso de cebollin y/o hojas de cebolla enriquecidos, ya que su producción también es fácil y, además estos productos se consumen frescos (sin almacenamiento prolongado)^{54,55}.

Otra alternativa para el incremento de ingesta de Se es el consumo controlado de nueces de Brasil, que contienen hasta el 75 % del selenio total en forma de Se-Met^{48,68,69}.

En búsqueda de nuevas, potenciales fuentes dietéticas del Se, este trabajo se enfoca en el posible uso de bacterias probióticas *Lactobacillus* fortificadas con selenio. En concreto, se estudia la incorporación del elemento en estas bacterias.

1. 2. 3. Concepto de metalómica

Dentro de un organismo vivo existe una distribución de "hetero-elementos" entre órganos, tejidos, células y dentro de los compartimientos sub-celulares. A nivel molecular, la función biológica específica de estos elementos depende de sus enlaces con biomoléculas. Así, la funcionalidad de metaloproteínas críticamente depende de la presencia del metal (Cu, Fe, Zn, Mo o Se). Otro grupo de proteínas tales como transferrina, proteína P, o proteína W tienen la función de transportar elementos. Finalmente, existen proteínas y/o péptidos, que se expresan como la respuesta defensiva contra el estrés provocado por la presencia de metales pesados (metalotioneínas en animales y fitoquelatinas en plantas). El papel de algunos elementos se relaciona con sus especies de baja masa molecular, no asociadas con proteínas (aminoácidos no proteinogénicos del selenio, iones libres de calcio, magnesio, cobalamina, etc.) Los mecanismos responsables por las rutas metabólicas de los elementos y, específicamente por la incorporación de elementos a sus respectivos sitios de "acción" no se conocen con exactitud. La elucidación de estos mecanismos requiere de los estudios que permitan caracterizar globalmente el estatus de los elementos dentro de la célula, o de manera más general dentro de un organismo. En este contexto también es importante estudiar posibles interacciones antagónicas y/o sinérgicas entre diferentes elementos. Este tipo de estudios se engloban en el concepto de metalómica, definido precisamente como la caracterización cualitativa y cuantitativa de una totalidad de formas y/especies de diferentes metales y metaloides en un sistema biológico (célula, tejido, órgano, organismo), incluyendo las posibles interacciones entre ellos.¹¹¹⁻¹¹⁶

Una de los efectos benéficos del selenio es su habilidad de disminuir los efectos tóxicos de metales pesados^{14,22}. Este efecto protectorio ha sido observado en presencia de mercurio, cadmio y cromo en diferentes tipos de organismos^{14,117}. En este trabajo se lleva a cabo un estudio sobre posible efecto protectorio de selenio contra la toxicidad de cadmio en bacterias de la familia *Lactobacillus*.

1.3. Bacterias probióticas

Dentro del cuerpo humano, habitan unos 100 billones de bacterias de unas 400 especies distintas y de éstos, el 95% vive en el tracto digestivo, especialmente en el colon. Estas bacterias se encuentran perfectamente adaptadas al ser humano como su habitat natural¹¹⁸. Tener una flora intestinal estable y bien equilibrada es garantía de buena salud. Sin embargo, el organismo humano es constantemente expuesto a las bacterias exógenas provenientes de aire, agua y alimentos, que pueden afectar el equilibrio microbiano en el tracto digestivo. Se considera entonces benéfico fortalecer la flora natural mediante la ingesta de bacterias benéficas, llamadas probióticas. En el área de la nutrición, un probiótico se define como un producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) en un lugar del huésped y tras esto aumenta los efectos benéficos para la salud en este huésped^{119,120}. Cabe resaltar que, los productos comerciales tienen que presentar buena estabilidad en términos de viabilidad de microorganismos. Para ser consideradas como probióticas las bacterias tienen que ser habitantes normal del intestino humano, capaces de sobrevivir y reproducirse en este medio, ejercer efectos benéficos sin presentar características patógenas ni provocar intoxicaciones. En la Tabla 5 se presentan algunos de los microorganismos utilizados como probióticos^{119,121}.

Los *Lactobacillus* son bacterias presentes naturalmente en alimentos fermentados¹²². Fueron aisladas de la leche, pero se encontraron también en otros productos fermentados como carnes¹²³, derivados de la leche y vegetales^{124,125}. Es importante su buena estabilidad en productos de leche fermentados¹²⁶. Desde el punto de vista microbiológico, estas bacterias son gram positivas, no esporuladas, típicamente tienen forma alargada con un rango de tamaño de 0.5-1.2 μm de diámetro por 1-10 μm de largo, la temperatura óptima de su crecimiento es de 30 – 40 °C. Por otra parte son facultativos anaerobios, ácido tolerantes, y estrictamente fermentativos, sus requerimientos nutricionales son

complejos. Cuando el sustrato es lactosa, el principal producto de fermentación es el ácido láctico¹²⁷. Los *Lactobacillus* se clasifican en dos grupos, dependiendo de los productos de fermentación. Así, el grupo homofermentativo es el mayor y convierte casi completamente el azúcar en ácido láctico y el grupo heterofermentativo está constituido por formas que producen cantidades importantes de otros productos de fermentación, incluyendo bióxido de carbono, etanol, ácido acético y peróxido de hidrógeno¹²⁸.

Tabla 5 Microorganismos considerados como probióticos.

Especies de <i>Lactobacillus</i>	Especies de <i>Bifidobacterias</i>	Otras Bacterias Ácido Lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. reuteri</i>		

1.3.1 Efectos benéficos de *Lactobacillus*

Numerosos estudios han demostrado la viabilidad de diferentes cepas de *Lactobacillus* en el tracto digestivo^{129,130}. Es importante que, estas bacterias desplazan otros microorganismos, especialmente patógenos, mediante la competencia por los nutrientes intestinales y por los sitios de adhesión al mucus intestinal¹³¹⁻¹³⁴ como a las células epiteliales^{135,136} y, de esta manera, contribuyen en la prevención de las infecciones gastrointestinales. Así, los *Lactobacillus* pueden jugar un rol importante en la resistencia a la colonización de *Salmonella*^{137,138}. *Lactobacillus acidophilus* es capaz de inhibir coliformes en leches fermentadas y en el intestino de las ratas¹³⁹, *Lactobacillus rhamnosus* GG reduce la colonización de *Escherichia coli* en conejos¹⁴⁰ y en las células intestinales¹⁴¹. La

pre-incubación de la monocapa de los enterocitos Caco-2 con el probiótico, resultó en una reducción de la translocación de *E. coli* a través de la monocapa¹⁴². Las cepas de *L. acidophilus* y *Lactobacillus casei* Shirota pueden inhibir la colonización y crecimiento del *Helicobacter pylori* (reconocido como agente causante de la gastritis tipo B, de úlcera péptica y de cáncer gástrico) *in vitro* y exhiben una actividad antagonística contra *H. pylori* *in vivo*^{143,144}. Los productos de *Lactobacillus* (específicamente *Lactobacillus rhamnosus* GG) se recomiendan en los tratamientos con antibióticos con el fin de reestablecer una flora bacteriana saludable tanto en niños^{145,146} como en adultos¹⁴⁷.

Los *Lactobacillus* producen antibióticos capaces de eliminar la flora patogénica y forman una parte íntegra del sistema inmune¹⁴⁸⁻¹⁵². En la administración de *Lactobacillus casei* en conejos, a los que previamente se les inoculó toxinas de *E. coli* en el tracto digestivo, se observó un aumento de los niveles de inmunoglobulina A (IgA), lo que indica una mejor respuesta inmune local¹⁵³. De manera similar, en un estudio con ratas infectadas con *Trichinella spiralis* se reportó un aumento de las inmunoglobulinas G2b (IgG2b)¹⁵⁴. En ratones infectados con el virus de la influenza, la administración de estas bacterias aumentó la respuesta inmune innata del sistema respiratorio¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. En el caso de otra cepa (*Lactobacillus rhamnosus* GG), en experimentos *in vitro* se demostró la inducción de producción de citoquinas de tipo Th-1 TNF^{158,159} y la activación de respuesta inmunitaria innata¹⁶⁰. En estudios con animales, los *Lactobacillus rhamnosus* GG administrados oralmente tuvieron efectos inmunomodulatorios dependientes de la dosis y la duración en la actividad proliferativa de los linfocitos T y B¹⁶¹. En niños con infecciones por rotavirus, los *Lactobacillus rhamnosus* GG aumentan la formación de células secretoras de anticuerpos específicos para el rotavirus¹⁶²⁻¹⁶⁴. Los *Lactobacillus rhamnosus* GG pueden reducir las infecciones respiratorias infantiles y moderar su gravedad¹⁶⁵. Parece importante que, el aumento de la respuesta inmune en presencia de *Lactobacillus* ha sido observado independientemente de la especie hospedera o de antecedentes genéticos¹⁶⁶.

Los *Lactobacillus* producen enzimas necesarias para la formación de la enzima lactasa y ayudan en el mantenimiento del balance de pH en tractos

gastrointestinal y urinario¹⁶⁷. Ha sido reportado su papel en la reducción de los niveles de colesterol en la sangre y en la reconjugación de ácidos biliares¹⁶⁸. Además, producen ácido linoléico, cuyas propiedades anticancerígenas y antiteratógenas fueron observadas en los estudios con animales¹⁶⁹. Se probó la acción preventiva de una cepa de *L. casei* en ratones, observándose que se retrasa la aparición de tumores en comparación con el control¹⁷⁰. Los experimentos con la cepa *Lactobacillus rhamnosus GG* también demostraron el efecto benéfico reduciendo la incidencia de de tumores^{171,172}. Sin embargo, estas bacterias no son capaces de reducir la progresión de tumores¹⁷³.

Finalmente, hay que resaltar los efectos benéficos de *Lactobacillus* en el ecosistema vaginal y en el tracto urinario. Los *Lactobacillus* son dominantes en este hábitat, con 107 a 108 UFC/ g (unidades formadoras de colonias) de fluido vaginal en mujeres saludables premenopáusicas¹⁷⁴. Se ha encontrado que, la respuesta de las células epiteliales del útero a las bacterias es selectiva, esto es importante en la protección inmunológica del aparato reproductor de las hembras¹⁷⁵. En particular, el *L. casei Shirota* resultó ser un potente agente terapéutico en las infecciones del tracto urinario¹⁷⁶.

Puesto que no existen efectos adversos, se recomienda el consumo diario de los productos ricos en las bacterias de la familia *Lactobacillus* (entre otros probióticos), tales como yogurt cultivado y/o diferentes tipos de suplementos. En cuanto a la seguridad, se ha reportado que la ingesta prolongada de LAB (específicamente *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*) no provoca la formación de ácidos biliares secundarios que promueven el cáncer colorectal¹⁷⁷. La recomendación de consumo diario de los probióticos se hace cada día más fuerte, ya que diferentes actividades antropogénicas contribuyen de manera importante en el deterioro de la flora bacteriana natural. Así, el mayor uso de medicamentos, falta de control de antibióticos en productos alimenticios (carne, aves caseras, etc) y la contaminación química en nuestros alimentos y atmósfera tienen efectos fatales sobre la microflora intestinal. El estrés de la vida diaria, el humo del cigarrillo, el alcohol y las dietas que son altas en azúcares, grasas y productos químicos contribuyen a la erradicación de *Lactobacillus* de nuestro intestino¹⁷⁸.

Resumiendo, el consumo de probióticos (y el particular *Lactobacillus*) permite fortalecer, o incluso reconstruir la flora intestinal "amigable", protegiendo el organismo contra procesos patógenos¹²⁰. La idea de este trabajo ha sido explorar la viabilidad de la incorporación del selenio en los *Lactobacillus*, lo que pudiera aumentar el potencial benéfico de estas bacterias para la salud del hombre. Es importante mencionar que, la acumulación de selenio por *Lactobacillus* ha sido reportada en la literatura¹⁷⁹.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

El objetivo de este estudio ha sido lograr la incorporación de selenio en las bacterias *Lactobacillus in vivo*, caracterizar el rendimiento de dicha incorporación, la distribución del selenio en los microorganismos y su posible interacción con los elementos considerados como tóxicos. Para los fines comparativos, se estudió también la incorporación de estos elementos en diferentes cepas de levaduras.

2.2. Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones del crecimiento de bacterias del tipo *Lactobacillus* en presencia y en ausencia del selenio.
2. Evaluar cuantitativamente la incorporación del selenio en microorganismos y la biodisponibilidad del elemento en bacterias.
3. Evaluar el efecto de algunos elementos tóxicos en microorganismos (bacterias y levaduras).
4. Estudiar posible efecto protector del selenio en las bacterias expuestas *in vivo* a cadmio.

Capítulo 3

Parte Experimental

3. Parte experimental

3.1. Instrumentos

Espectrómetro de absorción atómica modelo 3110 (Perkin-Elmer) con horno de grafito (HGA 600), automuestreador AS60, equipado con el software AAWinlab (Perkin-Elmer, Überlingen, Alemania). La lámpara de cátodo hueco fue Perkin-Elmer Lumina y las condiciones instrumentales fueron las siguientes: línea espectral 196.0 nm; rendija 0.7 nm; corrección del fondo con lámpara de deuterio, atomización desde la plataforma de L'vov y área del pico como la modalidad de la señal analítica. El programa del ciclo de calentamiento: (1) secado (130 °C, 25 s ramp, 15 s hold), (2) pirólisis (1100 °C, 10 s ramp, 10 s hold), (3) cooling step (20 °C, 1 s ramp, 15 s hold), (4) atomización (2100 °C, maximum power heating, 4 s hold) y (5) limpieza (2700 °C, 1 s ramp, 3 s hold). Se utilizó un modificador de matriz (2 µg of Pd + 5 µg of Mg, 5 µL), el volumen de inyección 20 µL.

Cromatógrafo de líquidos (modelo 1050, Hewlett Packard) con detector espectrofotométrico de onda múltiple y detector fluorimétrico programable (modelo 1046A), ambos controlados por el paquete de software ChemStation. Columnas utilizadas: Gemini C18 (Phenomenex) de 150 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm y una columna rellena con la resina HW-50F (SecPak LMW).

Espectrofotómetro Spectronic 3000 con arreglo de diodos (resolución 0.35 nm, Milton Roy) equipado con el paquete de software User Data, v. 2.01 de Milton Roy, Inst. Co.

Espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente fue el modelo 7500ce de Agilent Technologies (con celda de colisión). Las condiciones instrumentales fueron las siguientes: la potencia 1500 W, flujo de gas nebulizador 1.22 L/min, el gas de celda de colisión fue H₂ con el flujo 4.0 mL/min, se monitorearon los isótopos ⁷⁸Se, ⁸⁰Se y ⁸²Se.

3. 2. Equipo y material de laboratorio

- Liofilizadora Labconco
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Centrifugadora IEC modelo HN-SII.
- Microcentrifuga Denver Instrument.
- Bloque del calentamiento para la digestión de las muestras (Multi-Block, Barnstead/Lab-line).
- Vortex Genie 2.
- Potenciómetro Corning (313 pH/temperatura.
- Purificador de agua (calidad de agua Milli Q); Labconco Water PRO PS
- Incubadoras a 30°C, 37°C sin agitación
- Asas de vidrio y de platino
- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo con tapa
- Mechero Bunsen
- Material de plástico (Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL, tubos de Eppendorf 1.5 mL)
- Micropipetas Eppendorf 0.5-10 µL, 20-200 µL y 200-1000 µL.
- Matraces Erlenmeyer de 50, 125, 250, y 500 mL.
- Plataformas de L'vov y tubos de grafito (Perkin- Elmer) pirolíticamente recubiertos.

3.3. Reactivos y disoluciones

Todos los solventes utilizados fueron de calidad cromatográfica, la pureza de los reactivos fue grado analítico y se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm).

Crecimiento de microorganismos.

Se utilizaron los siguientes reactivos: La peptona de caseína, peptona de soya, peptona de gelatina, dextrosa, agar bacteriológico, LB bacto triptona, extracto de levadura, extracto de carne (Bioxan); el cloruro de sodio, acetato de sodio, diamonio hidrógeno citrato (Sigma); el sulfato de magnesio heptahidratado, el sulfato de hierro heptahidratado (Carral); el fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico (KEM de León); el sulfato de magnesio (J. T. Baker); Tween 20.

Los medios de crecimiento sólidos fueron Agar-Soya, MRS, MLC, YPD y LB. Como medios líquidos se utilizaron MRS, MLC, YPD. Estos medios fueron preparados de la siguiente manera:

Agar-Soya: En 1 L de agua desionizada se disolvieron 15 g de peptona de caseína, 5 g de peptona de soya, 5 g de cloruro de sodio y 15 g de agar, se ajustó el pH a 7.3 ± 0.2

YPD sólido: En 1 L de agua desionizada se disolvieron 3.0 g de extracto de levadura, 10 g de peptona de gelatina, 20 g de dextrosa y 20 g de agar bacteriológico.

YPD líquido: Se preparó de la misma manera que el YPD sólido, pero sin agregar el agar.

MLC sólido: En 1 L de agua desionizada se disolvieron 5.5 g extracto de levadura, 12.5 g de peptona de caseína, 11 g de dextrosa, 1 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.25 g de fosfato de potasio monobásico, 0.25 g de fosfato de potasio dibásico, 10 g de acetato de Sodio, 0.005 g de sulfato de hierro heptahidratado, 0.005 g de sulfato de manganeso y 20g de agar bacteriológico, se ajustó el pH a 6.8 ± 0.1

MLC líquido: se preparó de la misma manera que el MLC sólido, pero sin agregar el agar.

MRS sólido: En 1 L de agua desionizada se disolvieron 10g de peptona de caseína, 5g de extracto de carne, 1g de extracto de levadura, 20g de glucosa, 2g de fosfato de potasio monobásico, 2g de di-amonio hidrógeno citrato, 1g de tween 20, 5g de acetato de sodio, 0.1g de sulfato de magnesio, 0.05g de sulfato de manganeso y 20 g de agar bacteriológico.

MRS líquido: se preparó de la misma manera que el MRS sólido, pero sin agar.

LB: En 1 L de agua se disolvieron 10 g de LB bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 20 g de agar bacteriológico.

Los medios fueron esterilizados en autoclave (15 min, 120°C). En los experimentos con selenio y otros elementos, las soluciones estándar de estos elementos se esterilizaron mediante filtración (0.22 μm) y se adicionaron a los medios para obtener la concentración del ion deseada.

Incorporación de los elementos en las bacterias.

Los reactivos utilizados fueron: el selenito de sodio, nitrato de cadmio y solución estándar (1000 mg/L) de arsénico (Sigma); El sulfato de cobre y el dicromato de potasio (J.T. Baker); el estándar de plata de (100 mg/L) (Kalium de Guadalajara).

Enzimólisis de bacterias.

Se utilizaron la pepsina y el ácido clorhídrico (Sigma). Para simular las condiciones del tracto digestivo, se preparó una solución de pepsina de 5 mg/mL ajustando el pH con el ácido al pH 1.0.

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC).

Los reactivos utilizados fueron: Tris, ácido clorhídrico, dodecilsulfato de sodio (SDS), hidróxido de sodio y β -mercaptoetanol (Sigma).

Se preparó la solución de 0.2 % SDS en Tris/HCl (50 mmol/L, pH 7.0), la que se utilizó en extracción de biomasa y como la fase móvil en separación cromatográfica.

Determinación del selenio (ETAAS y ICP-MS).

Se utilizaron los siguientes reactivos: la solución de 1000 mg/L de Se fue el estándar para espectrometría de absorción atómica Sigma y el ácido nítrico fue de Sigma. El ácido nítrico fue utilizado para digestión de las muestras.

Test de viabilidad de las células.

Los reactivos utilizados fueron: el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), el ácido clorhídrico y el isopropanol (Sigma). Se preparó una solución de MTT 1 mg/mL en el medio de cultivo MLC y una solución de HCl en isopropanol (40 mmol/L).

Ensayo espectrofotométrico de malondialdehído

Se utilizaron los siguientes reactivos: la eriglaucina A (J.T. Baker); el aliquat 336 (Aldrich); el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el acetato de etilo (Sigma). A partir de estos reactivos se preparó una solución de eriglaucina A al 6.25×10^{-4} % en agua, una solución 0.06% de aliquat 336 en acetato de etilo, una solución 0.6% de TBA en ácido acético 4 mol/L a pH 2.5.

Análisis cromatográfico de fitoquelatinas (PC's):

Los reactivos utilizados fueron: el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido trifluoroacético (TFA), borohidruro de sodio, ácido 4-(2-hidroxiethyl) piperazina-1-propanesulfónico (HEPPS), ácido metanesulfónico (MSA) y glutationa (GSH) (Sigma); el ácido heptafluorobutírico (HFBA) (Fluka); el acetonitrilo y el metanol (Fisher). El agente derivatizante para las fitoquelatinas fue monobromobimano (mBrB) de Sigma.

Se prepararon las siguientes soluciones: 6.4 mmol/L DTPA en 0.1% de TFA, una solución de borohidruro de sodio 10 mmol/L en NaOH (50 mmol/L), una solución 2 mmol/L de mBrB en acetonitrilo, una solución conteniendo 0.3 mol/L de HEPPS y 6.5 mmol/L de DTPA, y una solución 1 mol/L de MSA.

Los estándares de las fitoquelatinas fueron proporcionados por Dr. Joseph A. Caruso de la Universidad de Cincinnati. Estos estándares incluyeron PC-2, PC-3, PC-4.

Las fases móviles en la separación cromatográfica fueron: A = 0.05 % ácido heptafluorobutírico; B = Acetonitrilo; C = Metanol.

3.4. Muestras microbiológicas

Como fuentes de bacterias lácticas se utilizaron los siguientes productos comerciales: Chamito, Yacult, Bonacult, Activa, Jocoque y las tabletas Sinuberase que son comprimidos de *Lactobacillus*. Además se utilizó la cepa de *Lactobacillus acidophilus* de laboratorio (proporcionada por Dr. J. Félix Gutiérrez Corona).

Las cepas de levaduras fueron proporcionadas por el Dr. Joseph A. Caruso de la Universidad de Cincinnati. Estas cepas incluyeron: *Kluyveromyces marxianus* (Km); *Yarrowia lipolytica* (Yl), *Candida maltosa* (Cm); *Saccharomyces bayanus* (Sb); *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión

De acuerdo con los objetivos, el presente trabajo tiene dos vertientes. Tomando en cuenta la importancia del selenio para la salud, su insuficiente ingesta en poblaciones de muchas regiones geográficas y ciertas limitaciones de los suplementos nutricionales comerciales (en cuanto a tipo y concentración de la forma biológicamente activa), en primer lugar se ha investigado la incorporación del selenio en bacterias probióticas *Lactobacillus*. Las bacterias fortalecidas pudieran formar una interesante alternativa en la suplementación. Para los fines comparativos, se examinó también la eficacia de dicha incorporación en diferentes cepas de levaduras, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en la producción de los suplementos comerciales. Por otro lado, las bacterias y levaduras del estudio se utilizaron como simples modelos biológicos para observar posibles efectos de algunos elementos considerados como tóxicos en este tipo de microorganismos. En el caso de bacterias, se llevó a cabo el estudio analítico enfocado al posible efecto protector del selenio contra la toxicidad de cadmio. Los resultados obtenidos en los dos aspectos que se acaban de mencionar, se describen sistemáticamente en las siguientes secciones.

4.1. Estudio analítico para la obtención de microorganismos enriquecidos *in vivo* con selenio

Los resultados de la revisión bibliográfica presentados en la sección 1.1.5. indican claramente que, la viabilidad del organismo, aumento de biomasa y el rendimiento de incorporación del selenio dependen fuertemente de las condiciones empleadas para su crecimiento. En esta parte de trabajo se examinaron diferentes fuentes de las bacterias *Lactobacillus* y medios de cultivo, variando las concentraciones de selenito de sodio en el medio y las condiciones tales como temperatura, tiempo, cantidad de inóculo, etc. En cada uno de los casos, se llevó a cabo el control analítico de crecimiento de la biomasa y, en su caso se evaluó la eficacia de incorporación del selenio. En los cultivos, donde se

observó mayor grado de incorporación se evaluó la biodisponibilidad del selenio, mediante la simulación de las condiciones de enzimólisis en el tracto digestivo.

El crecimiento de levaduras en presencia de selenio ha sido estudiado extensivamente y, en este estudio se utilizaron las condiciones reportadas en la bibliografía^{10,79}. En principio, estos microorganismos se utilizaron para los fines comparativos. Puesto que *Saccharomyces c.* fortificadas con Se forman base de los suplementos comerciales, es importante comparar la incorporación de Se en estos organismos respecto a bacterias lácticas, estudiadas en este trabajo como posible fuente nutricional del elemento. Por otro lado, se realizó la comparación del potencial de diferentes cepas de levadura para la acumulación del selenio.

4.1.1. Bacterias del grupo *Lactobacillus*

En los primeros experimentos se utilizó la cepa de laboratorio *Lactobacillus acidophilus* y tabletas Sinuberase que contienen los *Lactobacillus acidophilus*. Debido a problemas con el crecimiento en las condiciones de laboratorio, se incluyeron otras fuentes de bacterias que fueron bebidas lácticas Yacult (Ya), Chamito (Ch), Bonacult (Bo), Activia (Ac) y Jocoque (Jo). Los resultados del estudio realizado por la PROFECO en el año 2004 revelaron que, entre 11 bebidas lácteas fermentadas del mercado mexicano, el Yacult contiene bacterias *Lactobacillus casei shirota*, el Chamito Nestlé contiene *L. johnsonii* y *L. helveticus* y el Bonacult contienen *L. casei rhamnosus*¹⁸⁰.

4.1.1.1. Estudio de las condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de bacterias contenidas en los productos lácteos, se probaron diferentes diluciones (con peptona al 0.15 % m/m), con el fin de seleccionar la más adecuada cantidad de inóculo. Los cultivos se llevaron a cabo en medios sólidos (P – placa) y en medios líquidos (L). Los cultivos sólidos se prepararon en cajas de Petri, inoculando 50 µL de la suspensión de bacterias. Para crecimiento en el medio líquido, se utilizaron tubos de ensayo con 10 mL de

medio, a los que se agregaron 350 μL de bacterias en suspensión. La composición de los medios de cultivo MRS, MLC, LB y YPD se describe en la parte experimental. En búsqueda de las mejores condiciones de crecimiento se utilizaron varias temperaturas y tiempos de incubación, sin y con agitación. Las condiciones y resultados cualitativos (crecimiento "sí" o "no") de estos experimentos se resumen en la Tabla 6. Se puede observar que, bajo las condiciones empleadas, las leches fermentadas resultaron ser mejores fuentes de bacterias lácticas respecto a la formulación farmacéutica e incluso la cepa de laboratorio. En cuanto a la composición del medio, el mayor aumento de biomasa se observó al utilizar los medios ricos MLC y MRS, de acuerdo con los datos bibliográficos¹⁸¹. Para los fines de este trabajo se seleccionó el medio MLC, debido a su fácil preparación y esterilización. Para obtener los inóculos primarios se utilizó medio sólido. El crecimiento de biomasa y la incorporación de selenio se obtuvieron en el medio líquido. Cabe resaltar que, las condiciones de cultivo sumergido (en medio líquido) presentan una serie de ventajas para este trabajo: (1) mayor tamaño de cultivo; (2) mejor acceso del selenio a biomasa; (3) menor riesgo de contaminación; (4) separación de bacterias del medio mediante filtración; (5) simple matriz química en la etapa de determinación del selenio. En cuanto a las condiciones de incubación, se seleccionó la temperatura de 37 °C y sin agitación. La selección de tiempo se dejó para la siguiente etapa del estudio, enfocada al crecimiento de bacterias en presencia de selenio. Finalmente, para estudios posteriores se seleccionaron Yacult Chamito, Bonacult y Jocoque, ya que estos presentaron el mejor crecimiento de biomasa, lo que se puede apreciar en la Figura 2.

Tabla 6 Estudio de las condiciones experimentales en el crecimiento de bacterias lácticas.

Bacteria y/o Producto	Preparación	Medio		Incubación		Crecimiento
		P	L	T (°C)	t(hrs)	
Pastilla Sinuberasa	Suspensión en agua (5mL/ 1 past) 20µL para inocular	YPD	YPD	30 (P, L)	96	No
		MRS	MRS	30 (P, L)	96	No
<i>L. acidophilus</i>	La cepa venía inoculada en medio líquido	YPD	YPD	30 (P, L); 37 (P, L)	96	No
		MLC	MLC	Ambiente (L)	24	No
				30 (P)	24	No
				30 (L)	48	No
				39 (P, L)	24	No
		LB	-	30	96	No
				37	96	No
		MRS	MRS	Ambiente (L)	24	No
30 (P)	24			No		
Yacult	Dil. 1/10 y 1/100 con peptona	MLC	MLC	37 (P, L)	24	Si
		MRS	MRS	37 (P, L)	24	Si
Chamito	Dil. 1/10 y 1/100 con peptona	MLC	MLC	37 (L)	24	Si
				37 (P)	72	Si
				30 (P)	72	Si
Bonacult	Dil. 1/10 y 1/100 con peptona	MLC	MLC	37 (P, L)	24	Si
		YPD	YPD	37 (P, L)	48	No
Activia	Dil. 1/10, 1/100, 1/1000 con agua	YPD	-	37	48	No
		MLC	MLC	37	48	Si
		Agar Soya	-	37	48	Si
		MRS	MRS	37	48	Si
Jocoque	Dil. 1/10 y 1/100 con peptona	-	MLC	37	24	Si

P – placa; L – líquido; MRS, MLC, LB y YPD – medios líquidos que se describen detalladamente en la Parte Experimental.

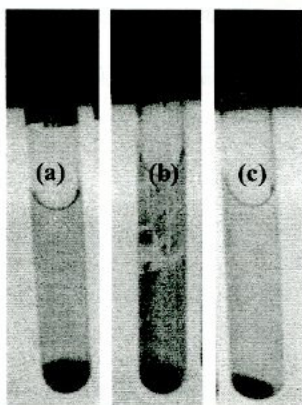


Figura 2. Crecimiento de las bacterias de Yacult (a), Chamito (b) y Bonacult (c) en medio líquido MLC, después de 24 hrs de incubación a 37 °C.

Una vez seleccionadas las fuentes de bacterias (Ya, Ch, Bo y Jo), el medio líquido MLC y las condiciones de incubación (37 °C sin agitación), se procedió con el estudio de incorporación de selenio en las bacterias. Para ello, se utilizó selenito de sodio (Se(IV)), debido a mayor eficacia de incorporación respecto a la forma Se(VI), reportada en otros estudios^{10,79}. En primer lugar se obtuvo un preinóculo, agregando 350 μ L del cultivo original a 5 mL de medio MLC e incubando a 37 °C durante 24 hrs (el preinóculo fue obtenido sin agregar selenio). Posteriormente, este preinóculo se colocaba en los medios conteniendo Se(IV). Para minimizar la inhibición de crecimiento observada por algunos autores en presencia de Se(IV)^{2,54,55}, se siguieron varios procedimientos de incorporación. En estos procedimientos varía el tiempo de contacto con el medio y la concentración de Se(IV). En particular, dicha concentración se aumentaba gradualmente mediante la transferencia de las bacterias de un medio con la concentración inferior al medio fresco conteniendo la concentración mayor. En la Tabla 7 se presentan las características de cada una de los procedimientos utilizados.

Tabla 7 Procedimientos empleados para la incorporación de Se en bacterias.

Procedimiento	Etapa	Volumen de medio (mL)	mg/L de Se (IV)	Tiempo
1	1	50	25	24 hrs
	2	150	25	72 hrs
	3	150	5.0	72 hrs
	4	150	5.0	1 semana
5	1	50	1.0	24 hrs
	2	50	1.0	24 hrs
	3	150	2.5	72 hrs
	1	50	1.8	24 hrs
	2	50	2.0	24 hrs
	3	50	2.0	24 hrs
	4	100	2.0	24 hrs
6	5	100	2.0	24 hrs
	6	100	2.5	24 hrs
	7	150	2.5	24 hrs

4.1.1.2. Incorporación del selenio a biomasa

Los resultados de experimentos realizados utilizando bacterias provenientes de Yacult (Ya), Chamito (Ch), Bonacult (Bo) y Jocoque (Yo) revelaron que, la incorporación del selenio a biomasa depende fuertemente de tipo y/o fuente de las bacterias y del procedimiento aplicado (Tabla 7). El problema que se presentaba en muchos cultivos fue la reducción masiva de Se(IV) agregado al medio de crecimiento a Se elemental (Se^0 - color rojo). La mejor apariencia de cultivos (color paja y rosado) se observó al utilizar el esquema de incorporación, donde la concentración de selenio aumentaba gradualmente (esquema 5 y 6 en Tabla 7) y en cultivos de bacterias provenientes de Yacult, Chamito y Bonacult.

Para evaluar cuantitativamente la incorporación de selenio en las bacterias, se llevó a cabo la determinación del elemento en biomasa mediante la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Para ello, los cultivos se filtraron, lavaron y se obtuvo la biomasa liofilizada. Posteriormente, en tubos Eppendorf (1 mL), se pesaron 5 mg de la biomasa liofilizada y se agregaron 200

μL de ácido nítrico concentrado. Los tubos se cerraron y se colocaron en el bloque de calentamiento para su digestión (65 °C por 1 hora, 110 °C por 1 hora)^{116,182-184}. Una vez enfriadas las muestras a temperatura ambiente, se aforó el volumen a 1.0 mL con agua desionizada y, después de una dilución apropiada, se llevó a cabo la cuantificación del Se por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Las condiciones instrumentales se resumen en la Tabla 8¹⁸³. Los resultados obtenidos en tres diferentes cultivos fortificados y en un cultivo control (sin agregar Se(IV) en el medio) se presentan en Tabla 9. Es de notar que, los valores obtenidos en cultivos de color rojo fueron significativamente mayores respecto al cultivo que presentó color paja. Desgraciadamente, la reducción de Se(IV) fue observada en presencia de casi todas cepas. Para eliminar el precipitado de selenio elemental y obtener la información sobre la fracción del elemento realmente incorporada a la biomasa, se obtuvieron los extractos de biomasa y se llevó la separación por cromatografía de exclusión por tamaño molecular. Para la extracción, se utilizaron 10 mg de bacterias liofilizadas, a los que se agregaron 0.5 mL de 0.2 % SDS en Tris/HCl (50 mmol/l, pH 7.0). Se agregó también 5 % de β -mercaptoetanol para prevenir posible oxidación durante manejo de muestra. La mezcla se colocó en el baño de ultrasonido (10 min), se centrifugó (10000 rpm, 15 min) y el sobrenadante fue introducido en la columna SEC.

La separación se obtuvo utilizando la fase móvil de la misma composición que la solución extractante, con el flujo de 1.2 mL/min y detección espectrofotométrica a 280 nm. Se observó la elución de los compuestos de alta masa molecular en forma de un solo pico. Esta fracción de la columna fue recolectada y se llevó a cabo la determinación de selenio por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9. Cabe resaltar que, estos resultados fueron obtenidos para tres tipos de cultivos (Yacult, Chamito y Bonacult) obtenidos en el procedimiento N° 6 (Tabla 7).

Tabla 8 Las condiciones instrumentales en la determinación de selenio por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

Línea spectral	196.0 nm			
Anchura de la rendija	0.7 nm			
Corrección del fondo	Lámpara de deuterio			
Superficie de atomización	Plataforma de L'vov			
Señal analítica	Área del pico			
Ciclo de calentamiento	Etapa	Temp, °C	Ramp, s	Hold, s
	Secado	130	25	15
	Pirólisis	1100	10	10
	CDS	20	1	15
	Atomización	2100	0	4
	Limpieza del tubo	2700	1	3
Modificador de matriz	2 µg Pd + 5 µg Mg (5 µL)			
Volumen de muestra	20 µL			

Tabla 9 Resultados de determinación de Se total en diferentes cultivos de bacterias (mg, o µg de Se por 1 gramo de biomasa liofilizada)

Fuente de bacterias	Apariencia	Se total ¹ , mg/g	Se incorporado ² , µg/g
Chamito	Rojo	3.06	62.2
Yacult	Rojo	1.34	34.8
Bonacult	Blanco	0.82	405
Bonacult-blanco (sin Se)	Blanco	10 µg/g	7.37

¹ – valor obtenido en la digestión de la muestra por vía ácida

² – valor obtenido analizando fracción de la columna SEC

En primer lugar se puede observar que, las concentraciones del selenio correspondientes a la fracción de alta masa molecular en cultivos fortalecidos son inferiores a la concentración obtenida en el análisis de las muestras digeridas con ácido nítrico. Para los cultivos donde ocurrió la reducción de selenio (rojos) la diferencia entre estos dos valores es muy grande. Lógicamente, la concentración determinada después de la digestión con ácido nítrico (Se total) corresponde al Se⁰ precipitado, mientras que la concentración evaluada mediante la extracción y el análisis SEC es la que refleja el proceso de incorporación del Se a bacterias.

Los resultados obtenidos en el análisis del cultivo Bonacult confirman lo anterior: los dos cultivos fueron de color paja (sin grandes cantidades del Se^0) y la diferencia entre Se total (digestión ácida) y Se incorporado (determinado en la fracción del extracto conteniendo compuestos de alta masa molecular) no es tan drástica como en cultivos rojos. En concreto, el contenido total de Se en el cultivo Bonacult fortalecido fue de 820 $\mu\text{g/g}$ y el contenido en la fracción de alta masa molecular fue de 405 $\mu\text{g/g}$ (respecto a la masa de bacterias liofilizadas). Parece interesante que, en el cultivo control los niveles de selenio obtenidos en los dos procedimientos fueron muy parecidos. El contenido de Se en esta cepa (10 $\mu\text{g/g}$) sugiere que los reactivos utilizados en el medio de crecimiento contenían sales de selenio en bajas concentraciones. De los resultados obtenidos se deduce que, las bacterias provenientes de Bonacult no provocan la reducción masiva del selenio en el medio y que incorporan selenio con mayor eficiencia que otras cepas del estudio.

4.1.1.3. Estudio de biodisponibilidad del selenio en bacterias enriquecidas

En esta parte de trabajo se evaluó la fracción "biodisponible" del selenio incorporado a las cepas de bacterias provenientes de Yacult, Chamito y Bonacult. De acuerdo con los reportes anteriores, la fracción "biodisponible" se obtuvo mediante enzimólisis de la biomasa, simulando las condiciones del tracto digestivo^{182, 185, 186}. Las formas de selenio solubilizadas en estas condiciones se pueden considerar biodisponibles. Para ello, para cada uno de los cultivos (Ya, Ch, Bo), en tubos Eppendorff (1.5 mL) se pesaron 10 mg de biomasa liofilizada y se agregó 1.0 mL de la solución de pepsina (5mg/mL) en ácido clorhídrico (pH 1.0). Las suspensiones fueron agitadas (vortex, 2 min) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Finalmente, las muestras fueron colocadas en el baño de ultrasonidos (10 min) y centrifugadas (10 000 rpm, 10 min). En los sobrenadantes obtenidos, considerados como la fracción "biodisponible", se determinó selenio mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10 Resultados de determinación de la fracción "biodisponible" de selenio incorporado en las bacterias (μg de Se por 1 gramo de biomasa liofilizada, entre paréntesis se presenta el por ciento del de Se respecto la cantidad incorporada a biomasa)

Fuente de bacterias	Apariencia	Se en biomasa, $\mu\text{g/g}$	Se "biodisponible", $\mu\text{g/g}$
Chamito	Rojo	62.2 (100 %)	34.8 (56 %)
Yacult	Rojo	34.8 (100 %)	14.9 (42 %)
Bonacult	Blanco	405 (100 %)	210 (52 %)
Bonacult-blanco (sin Se)	Blanco	7.27 (100 %)	4.10 (56 %)

Como fue de esperar, la mayor cantidad de selenio "biodisponible" se encontró en la cepa fortificada, proveniente de Bonacult (en μg de Se por 1 gramo de biomasa liofilizada). Parece interesante sin embargo que, independientemente de la cantidad del selenio incorporado, la fracción lixiviada en presencia de pepsina (pH 1.0) corresponde a aprox. 50 % (entre 42 y 56 %) de la concentración presente en la biomasa.

Resumiendo, los resultados obtenidos en esta parte de trabajo indican que, la cepa de bacterias provenientes de Bonacult presenta relativamente buen crecimiento en presencia de Se(IV), no provoca su reducción masiva y es capaz de incorporar selenio en cantidades apreciables, de los cuales aprox. 50 % puede ser biodisponible en las condiciones del tracto digestivo.

4.1.2. Diferentes cepas de levaduras

La mayoría de los suplementos comerciales contienen a las *Saccharomyces cerevisiae* fortificados con Se. Los niveles de selenio reportados en este tipo de productos fueron entre 1 y 2 mg/g ^{3,9,74,75,81,97-99}. Por otra parte, algunos autores sugirieron que otras cepas de levaduras pudieran presentar mayor capacidad para acumular el selenio¹⁸⁷. Con estos antecedentes, y con el fin de comparar levaduras y bacterias en términos de su habilidad para incorporar Se, en esta sección se evaluó la incorporación del elemento en las cepas

Saccharomyces c., *Saccharomyces bayanus*, *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces marxianus*.

4.1.2.1. Incorporación del selenio a biomasa

El medio de crecimiento fue el YPD, de acuerdo con los reportes anteriores^{10,79}. En primer lugar se examinó la tolerancia de las cepas a Se(IV). Para ello, se prepararon una serie de medios sólidos, conteniendo 0, 10, 25, 50, 75 y 200 mg/L de Se(IV), observándose que, las concentraciones de Se(IV) mayores de 50 mg/L provocaron inhibición del crecimiento. En base a estos resultados, para los experimentos futuros se seleccionaron tres concentraciones de selenito de sodio: 10, 25 y 50 mg/L (respecto a Se). Es de notar que, generalmente las levaduras presentaron mejor tolerancia a sales de selenio respecto a bacterias y en ningún caso se observó la reducción masiva de Se(IV) en el medio de cultivo.

Con el fin de obtener las levaduras fortificadas, en primer lugar se obtuvieron los preinóculos en medio sólido, sin agregar el selenio (cajas Petri, 30 °C, un día). Posteriormente, las pequeñas alíquotas de preinóculos (aprox. 0.2 cm²) se colocaron en tubos estériles (5 mL) conteniendo medio líquido con Se(IV) y los cultivos fueron incubados en 28 °C durante 48 hrs (con agitación). Para cada una de las cepas, se utilizaron tres concentraciones de selenito de sodio seleccionadas (10, 25 y 50 mg/L). En paralelo se obtuvieron los cultivos controles (en ausencia de Se). Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron, filtraron, lavaron con agua desionizada y se liofilizaron.

La determinación de selenio incorporado a las cepas se evaluó mediante la digestión de las muestras con ácido nítrico (el mismo procedimiento que para las bacterias) y el análisis por ICP-MS. Como estándares internos se utilizaron los iones de itrio y germanio (10 ng/mL cada uno). La introducción de la muestra (50 µL) al ICP fue por inyección en flujo, utilizando como portador el agua desionizada con el flujo 1 mL/min. La celda de colisión se optimizó con el estándar de selenio

(10ng/mL) con el flujo de hidrógeno de 4 mL/min. Los resultados obtenidos en este análisis se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11 Resultados de determinación de selenio total en cinco cepas de levaduras, fortalecidas con selenio *in vivo*.

Cepa	Se total, en biomasa liofilizada (µg/g)		
	10 mg/L Se en medio	25 mg/L Se en medio	50 mg/L Se en medio
<i>Saccharomyces c.</i>	13.2	496	2880
<i>Saccharomyces b.</i>	1790	1790	1790
<i>Kluyveromyces m.</i>	1120	4700	3140
<i>Yarrowia l.</i>	419	2750	2310
<i>Candida m.</i>	934	629	5890

En esta Tabla se observa que, la incorporación de Se en levaduras depende fuertemente de la concentración de Se(IV) en el medio de cultivo (excepto *Saccharomyces b.*). Para las concentraciones de selenio 10 mg/L y 25 mg/L, las *Saccharomyces c.* presentaron menor capacidad de incorporación respecto a otras cepas. Sin embargo, la concentración total de Se en *Saccharomyces c.* cultivadas en presencia de 50 mg/L de selenio incrementó considerablemente y fue mayor en comparación con *Saccharomyces b.* y *Yarrowia l.*, cuyo crecimiento se llevó a cabo en las mismas condiciones. Estos resultados indican buena tolerancia de la cepa utilizada comercialmente (*Saccharomyces c.*) a relativamente altas concentraciones de selenio en el medio. Es importante resaltar que, la cantidad del elemento incorporado a esta cepa en presencia de 50 mg/L de selenio en el medio fue comparable con los valores reportados por otros autores^{3,9,74,75,81,97-99}.

Por otra parte, la cantidad de selenio incorporado en *Kluyveromyces m.* y *Yarrowia l.* disminuyó al aumentar la concentración del selenio en el medio de 25 mg/L a 50 mg/L. Este resultado junto con el hecho de obtener menor cantidad de biomasa de los cultivos correspondientes indican que, selenio presente en la concentración 50 mg/L (y/o mayor) ejerce cierta toxicidad en estas dos cepas. Parece interesante, que la concentración de selenio en la biomasa de

Saccharomyces b. permanece constante, independientemente de la concentración de selenio en el medio (10 – 50 mg/L). Puesto que esta concentración (1790 µg/g) es mayor respecto a las observadas en la cepa comercial en presencia de 10 y 25 mg/L de selenio en medio, *Saccharomyces b.* podrían ser una interesante alternativa para la producción de suplementos nutricionales.

En cuanto a la comparación de bacterias LAB y levaduras, como ya se mencionó, las últimas resultaron tolerar mayores concentraciones de Se(IV) en el medio de crecimiento sin provocar la reducción masiva del selenio. Sin embargo, la cantidad de selenio incorporado por *Saccharomyces c.* en presencia de 10 mg/L de selenio en el medio (concentración de selenio total en biomasa 13.2 µg/g) fue significativamente inferior respecto a la cantidad incorporada a bacterias provenientes de Bonacult en presencia de 2.5 mg/L de selenio en el medio (405 µg/g). Estos resultados son alentadores en el contexto de posible uso de las bacterias LAB como suplementos de selenio. Sin embargo se requieren más estudios enfocados en la búsqueda de cepas LAB que toleren mayores concentraciones de Se(IV) y en la optimización de las condiciones de crecimiento.

4.2. Estudio analítico de los microorganismos expuestos in vivo a elementos tóxicos

Una vez demostrada y/o confirmada la habilidad de bacterias *Lactobacillus* y de cinco cepas de levaduras para acumular selenio, el segundo objetivo del estudio ha sido estudiar la respuesta de estos microorganismos a la presencia de algunos elementos considerados como tóxicos. Para levaduras, el estudio se enfocó en análisis de fitoquelatinas. En el caso de bacterias, se investigó el posible efecto protector del selenio contra la toxicidad de cadmio.

4.2.1. Posible efecto protector del selenio en bacterias expuestas a cadmio

En esta parte de trabajo, se utilizó la cepa de bacterias proveniente de la bebida Bonacult. Utilizando las mismas condiciones de cultivo que en las

secciones anteriores (medio líquido MLC, temperatura 37 °C, sin agitación), se examinó la tolerancia de bacterias a las concentraciones de cadmio hasta 5 mg/L. En presencia de concentraciones de Cd mayores de 1 mg/L se observó la inhibición total del crecimiento. En base a estos resultados, para el estudio se seleccionaron cinco concentraciones, obteniéndose los cultivos en presencia de 0; 100; 250; 400; 600 y 800 µg/L de cadmio. En paralelo, se obtuvo la segunda serie de cultivos, agregando al medio selenito de sodio (1 mg/L de Se).

El crecimiento de bacterias se evaluó midiendo la densidad óptica del cultivo. Para ello, a diferentes tiempos de incubación (0; 2.5; 5.0; 8; 10; 12; 24 hrs) se tomaron alícuotas de los cultivos y se midió el valor de absorbancia en 600 nm tomando como referencia el medio de cultivo. En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos. En primer lugar se observa que, en presencia del ión cadmio, la densidad óptica de cultivos disminuye respecto al cultivo control, indicando la inhibición de crecimiento. El efecto es proporcional a la concentración de Cd(II) en el medio y además, es más notorio en el tiempo correspondiente a 2 - 8 horas desde la inoculación. En cuanto al efecto del selenio, su presencia en el medio no afecta el crecimiento de las bacterias (Fig. 3; 0 µg/L Cd). Sin embargo, cuando el medio de cultivo contiene cadmio y selenio, se observa mejor crecimiento en comparación con cultivos obtenidos en presencia de cadmio (sin Se), lo que sugiere que exista el efecto protector de selenio contra la toxicidad de cadmio. La medición de densidad óptica carece de selectividad, por lo que a continuación, se llevó a cabo el ensayo espectrofotométrico de viabilidad de células. Este ensayo se basa en el uso del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), cuya forma reducida presenta en solución color violeta (máximo de su espectro de absorción en 570 nm)^{188, 189}. A las 2.5 hrs desde la inoculación, se tomaron alícuotas (200 µL) de cultivos expuestos a diferentes concentraciones de Cd(II) (la concentración de Se(IV) 1 mg/L) y se le agregaron 200 µL de la solución MTT para obtener su concentración final 0.5 mg/L. Las muestras fueron incubadas (37 °C, 4 hrs) y se agregaron 400 µL de la solución 40 mmol/L HCl en isopropanol. Después de la agitación (vortex), se les

dejó 10 min a temperatura ambiente para completar la reacción. Finalmente, las muestras se centrifugaron (10 000 rpm, 10 min) y se midió la absorbancia del sobrenadante en 570 nm.

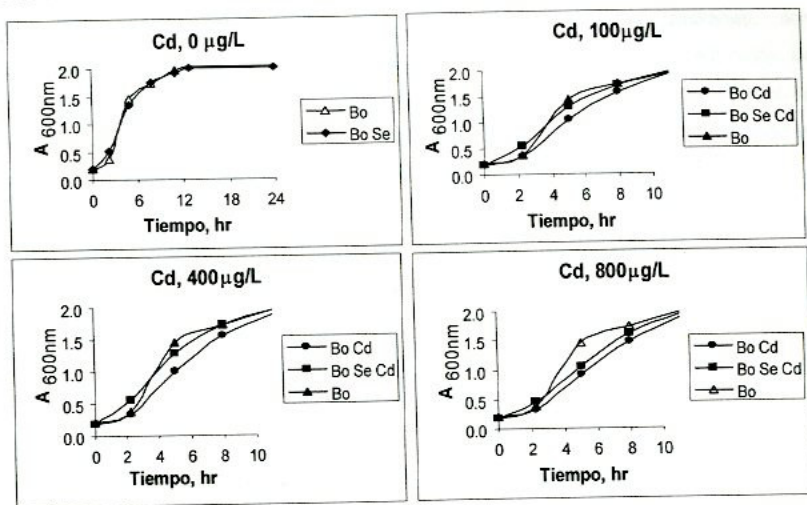


Figura 3. Efecto de las diferentes concentraciones de Cd(II) en el medio de cultivo en el crecimiento de bacterias provenientes de Bonacult: Bo – control, BoCd- cultivo presencia de Cd y BoCdSe – cultivo en presencia de Cd y Se.

En la Figura 4a, se observa de nuevo el mejor crecimiento de bacterias expuestas simultáneamente a Cd(II) y Se(IV), respecto a las expuestas al Cd(II). En la Figura 4b se presenta el efecto de crecientes concentraciones de Cd(II) en el medio en la reducción de MTT. Para evitar el efecto de cantidad de biomasa en la reducción de MTT, en el eje Y se muestra la relación entre valor de absorbancia (570 nm) y densidad óptica de la solución (600 nm). Se puede observar que, en presencia de Cd(II) (hasta 200 µg/L en el medio) la reducción de MTT es mucho mas notoria que en presencia de Cd(II) y Se(IV), mientras que para más altas concentraciones la señal de MTT reducido disminuye. Para interpretar estos resultados, es necesario señalar que existen dos efectos que potencialmente contribuyen en la reducción de MTT por los cultivos del estudio: (1) la respiración

de células como evidencia de su viabilidad (la reducción mediante enzimas mitocondriales) y (2) sobreproducción de las especies de oxígeno reactivas en el estado de estrés oxidativo (provocado por Cd(II)). De ahí, los resultados obtenidos sugieren, que Cd(II) provoca el estrés oxidativo en las bacterias, con sobreproducción de las especies oxígeno reactivas (aumento de reducción de MTT). La presencia de Se(IV) aparentemente disminuye este efecto nocivo de Cd(II). Cabe resaltar que, el efecto protector de Se(IV) se observa en todo el intervalo de concentraciones de Cd(II) estudiado (a 2.5 hrs de crecimiento).

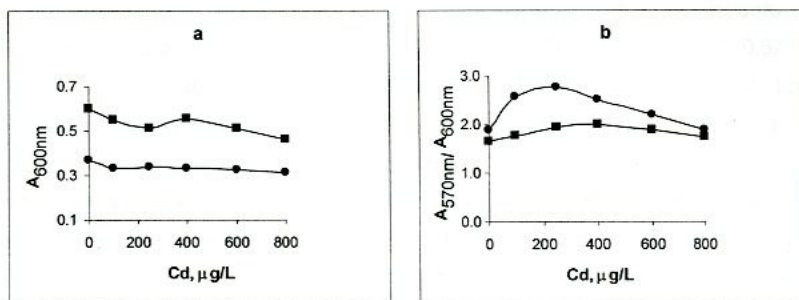


Figura 4. Efecto de crecientes concentraciones de Cd(II) en: (a) el crecimiento de bacterias y (b) reducción de MTT (—●— Bacterias expuestas a Cd(II) y —■— Bacterias expuestas a Cd(II) + Se(IV))

Para confirmar que la exposición a Cd(II) aumenta el estado de estrés oxidativo en las bacterias, se llevó a cabo la determinación espectrofotométrica de malondialdehído, considerado como bioindicador de peroxidación lipídica. Para ello, se utilizó el micro ensayo desarrollado por Serafin y col.¹⁹⁰. Este procedimiento se basa en la formación de aducto MDA-TBA (malondialdehído - ácido tiobarbitúrico) y emplea erioglaucina A como el estándar interno. La señal analítica se obtiene a partir de espectros derivados de primer orden. Utilizando la técnica de cruce en cero, las derivadas de absorbancias en 524.13 nm y en

644.44 nm corresponden a las contribuciones espectrales netas de MDA-TBA y de eriglaucina A respectivamente.

La señal analítica S se define como la relación de las dos contribuciones y es proporcional a la concentración de MDA en la solución:

$$S = {}^1D_{543.13\text{nm}} / {}^1D_{644.44\text{nm}}$$

Para el análisis de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de Cd(II) y/o a Cd(II) + Se(IV) (1mg/L de Se), después de 2.5 hrs de crecimiento se tomaron alícuotas (20 μL) y se les agregaron 200 μL de la solución TBA (0.67 % TBA en ácido acético, pH 2.5) y 200 μL de eriglaucina A ($6.25 \cdot 10^{-4}$ %). Las muestras fueron incubadas (100°C , 45 min) y después de enfriar a temperatura ambiente, se les agregaron 40 μL de aliquat 336 (0.06 %) y 300 μL de acetato de etilo. El aliquat 336 se utilizó para formar pares iónicos con eriglaucina A y de esta forma lograr la extracción del estándar interno junto con el aducto MDA-TBA a la fase orgánica (acetato de etilo). Para la extracción, las muestras fueron agitadas (vortex), centrifugadas (10 000 rpm, 5 min) y se registraron los espectros de absorción en la región de longitudes de onda 450 – 700 nm utilizando como referencia la solución de aliquat 336 en acetato de etilo. Los espectros obtenidos fueron analizados utilizando el programa GRAMS/386 TM. Los espectros fueron filtrados (25 puntos), se obtuvieron las primeras derivadas ($\Delta\lambda = 9 \text{ nm}$) utilizando el algoritmo de Savitzky – Golay¹⁹¹ y se calculó la señal analítica S. Cuantificación del MDA se llevó a cabo mediante la calibración externa (0 – 10 $\mu\text{mol/L}$ MDA).

En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos. Es de notar que, en ausencia de selenio, el ión cadmio (hasta su concentración 250 $\mu\text{g/L}$) aparentemente provoca un aumento de la concentración de MDA respecto al cultivo control. Esto confirma que la toxicidad de cadmio en las bacterias se manifiesta mediante el aumento de estado de estrés oxidativo. Sin embargo, cuando la concentración del ión cadmio fue mayor de 250 $\mu\text{g/L}$, la concentración de MDA disminuyó. En concreto, para la concentración de 400 $\mu\text{g/L}$ Cd(II) en el

medio, la concentración de MDA fue inferior respecto al cultivo obtenido en ausencia de cadmio. Este efecto pudiera adscribirse a la inhibición de crecimiento en presencia de altas concentraciones de cadmio. En este caso, la baja concentración de MDA en el cultivo con cadmio se debería a la menor cantidad de biomasa respecto al cultivo control (sin Cd(II)). Por otro lado, ha sido reportado que, un aumento de los productos de peroxidación lipídica puede activar un mecanismo defensivo a nivel mitocondrial, en el que dichos productos son inactivados mediante la reacción con amino ácidos¹⁹².

Los resultados presentados en la Figura 5 indican de nuevo el efecto protector de Se(IV) contra la toxicidad de Cd(II) en las bacterias, puesto que en su presencia no se observa ningún incremento de MDA. Cabe señalar que, las concentraciones de MDA fueron prácticamente iguales en el cultivo control (sin Cd(II) y sin Se(IV)) y en el cultivo expuesto a Se(IV), lo que confirma que selenito /hasta su concentración 1mg/L) no provoca ningún aumento del estado de estrés oxidativo en bacterias.

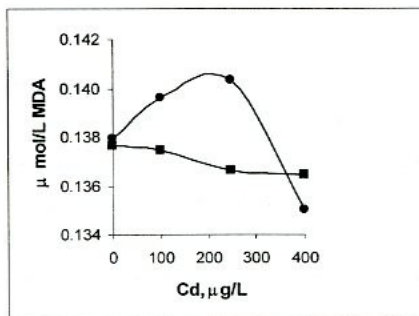


Figura 5. Efecto de la concentración de iones cadmio (—●—) y de 1 mg/L Se(IV) + Cd(II) (—■—) en la concentración de malondialdehído en cultivos de bacterias provenientes de Bonacult a 2.5 hrs desde la inoculación.

4.2.2. Inducción de fitoquelatinas en las levaduras

Los organismos vegetales responden a la toxicidad de los metales pesados a través de varios mecanismos, uno de los cuales es su acomplejamiento por una familia de ligandos de tipo peptídico que contienen cisteína y que son llamados fitoquelatinas (PCs). La estructura general de estos compuestos es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n varía entre 2 hasta 11. Las PCs son consideradas como las principales estructuras que acomplejan metales en los organismos antes mencionados. La biosíntesis de las PCs ocurre en presencia de ión metálico que activa la enzima fitoquelatina sintetasa. La glutatión es el sustrato de este enzima en la siguiente reacción¹⁹³:



Los primeros estudios sobre las PCs fueron reportados en los años 80 del siglo pasado. La gran mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha se basan en los resultados obtenidos en material de plantas. Sin embargo, se han encontrado algunos reportes sobre la inducción de PCs en algas y en micro organismos tales como levaduras¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Esta parte de trabajo se enfoca en el análisis de fitoquelatinas en extractos de diferentes cepas de levaduras expuestas *in vivo* a iones de cadmio, o arsénico. Para ello, se obtuvieron los cultivos de las cinco cepas del estudio (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces marxianus*), siguiendo el protocolo de crecimiento utilizado para la incorporación del selenio. En primer lugar, se obtuvo el preinóculo en ausencia de iones de interés. Posteriormente, a partir de este preinóculo, se obtuvieron cultivos sumergidos en presencia de 5 mg/L de Cd(II), 5 mg/L de As(III) y el cultivo control. Después de 24 hrs de crecimiento, las levaduras se filtraron, lavaron y liofilizaron. Para la ruptura de paredes celulares se agregó el nitrógeno líquido y se molió en un mortero.

El análisis de fitoquelatinas se llevó a cabo en las siguientes etapas: (i) extracción de compuestos de tipo tioles (aminoácidos, PCs y otros péptidos conteniendo grupos -SH); (ii) reducción para garantizar la forma -SH de tioles; (iii) derivatización y (v) separación cromatográfica con detección espectrofluorimétrica.

En la etapa de extracción (i) es importante evitar la degradación de tioles y su posible oxidación¹⁹⁷. En este trabajo, se utilizaron 5 mg de biomasa liofilizada y homogenizada a los que se agregaron 350 μL de 6.4 mmol/L ácido dietilentiuramipentaacético (DTPA) en 0.1 % ácido trifluoroacético. El DTPA se utilizó como agente acomplejante, para evitar la oxidación de grupos -SH por iones metálicos. El ácido trifluoroacético se usó para desnaturalizar y precipitar proteínas. Después de agitación (vortex), las muestras se dejaron por 30 min y luego, se colocaron en el baño de ultrasonido por 5 min. En la etapa de reducción (ii), a las muestras se agregaron 87.5 μL de la solución de 10 mmol/L borohidruro de sodio (en 50 mmol/L NaOH)^{197,198}. Las muestras se centrifugaron (10 000 rpm, 10 min), conservando el sobrenadante (40 μL).

En los extractos obtenidos, se llevó a cabo el análisis de PCs utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa con la detección espectrofluorimétrica, previa derivatización de los grupos -SH con monobromobimano (Figura 6,^{197,198}).

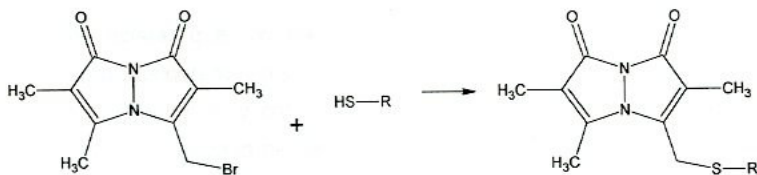


Figura 6. Ecuación de la reacción de monobromobimano con el grupo tiol para formar un compuesto fluorescente¹⁹⁹

Para la reacción de derivatización (iii), se tomaron 40 μL del extracto de levaduras, se les agregaron 100 μL de la solución conteniendo 0.3 mol/L de HEPPS y 6.5 mmol/L de DTPA y 30 μL de la solución de 2 mmol/L

monobromobimano en acetonitrilo. Los tubos se agitaron (vortex) y se dejaron reaccionar 30 min en la oscuridad, se le agregaron 40 μL de la solución de 1 mol/L ácido metanesulfónico y 100 μL de agua. Después de agitación, estas soluciones (20 μL) fueron introducidas al sistema cromatográfico (iv). La separación se llevó a cabo por la técnica de pares iónicos, en la columna de fase inversa (Gemini C18) y utilizando el ácido heptafluorobutírico (HFBA) como contraión. La elución fue en gradiente, utilizando tres fases móviles: A = 0.05 % HFBA; B – acetonitrilo; C = metanol y flujo total de 0.8 mL/min. El programa de gradiente se presenta en la Tabla. 12. La detección espectrofluorimétrica se llevó a cabo utilizando la longitud de onda de excitación $\lambda = 380 \text{ nm}$ y de emisión $\lambda = 480 \text{ nm}$.

Tabla 12 Programa de elución en gradiente en la separación de fitoquelatinas (A 0.05 % HFBA; B = acetonitrilo; C = metanol).

Tiempo, min	% A	%B	%C
0.5	82	3	15
4.0	78	3	19
11.0	75	3	22
12.0	53	17	30
17.0	53	17	30
18.5	45	25	30
19.0	82	3	15

Cabe aclarar que, en los experimentos preliminares, se utilizaron las condiciones cromatográficas reportadas en la bibliografía^{197,200}. En base al método reportado por Doring, S. y col.²⁰⁰, se propusieron una serie de modificaciones (condiciones de la reacción de derivatización, tipo de columna y de fase móvil), logrando la separación de fitoquelatinas y de sus precursores (L-cisteína, γ -glutamil cisteína y glutatona) en un tiempo más corto (20 min respecto a los 70 min)^{199,200}. Partiendo de los reportes sobre la cuantificación indirecta de PCs^{201,202}, el proceso de calibración se llevó a cabo utilizando la señal de glutatona (GSH). Para ello, se registraron una serie de cromatogramas de las soluciones estándar de glutatona (0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10; 12 $\mu\text{mol/L}$), midiendo la señal analítica como área del pico cromatográfico. La señal de fluorescencia relativa (F) fue

proporcional a la concentración micromolar de glutatona (C_{GSH}) en la solución de acuerdo con la siguiente ecuación de calibración ($R^2 = 0.9940$):

$$F = -8.051 \cdot 10^{11} C_{GSH}^2 + 4.288 \cdot 10^7 C_{GSH} - 1.160$$

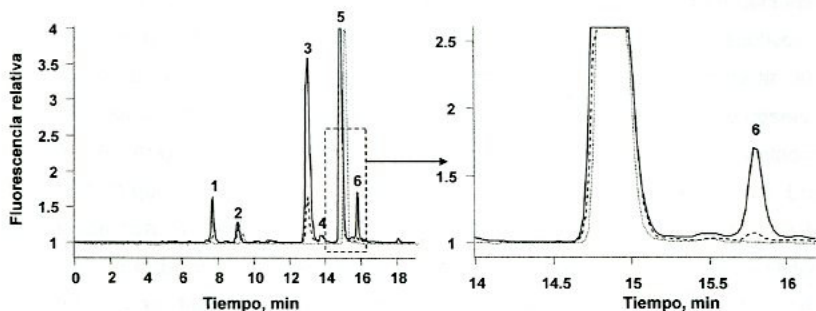


Figura 7. Típicos cromatogramas de extractos de *Yarrowia lipolitica*: (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg/L de Cd(II) en el medio de crecimiento. Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – estándar interno; 3 – glutatona; 4 - γ -glutamilsteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.

En la Figura 8 y 9, se presentan cromatogramas obtenidos en el análisis de extractos de *Yarrowia lipolitica* y de *Kluyveromyces marxianus*, controles y expuestos a cadmio. En estos cromatogramas se observan una serie de picos, asignación de los cuales se obtuvo mediante comparación de los tiempos de retención con los estándares disponibles (γ -glutamilsteína, glutatona, fitoquelatinas, PC-2, PC-3 y PC-4 y N-acetilcisteína como estándar interno) y mediante el método de adición de estándar. Es importante resaltar que, el estándar interno fue necesario debido a cambio de tiempos de retención conforme cambiaba la temperatura del laboratorio (durante 3-4 horas entre mañana y medio día). El pico marcado con el número 1 correspondió a elución de cisteína, el pico 2 fue el estándar interno, el pico 3 fue la glutatona, el pico 4 γ -glutamilsteína, pico

5 se adscribió al producto de descomposición de monobromobimano^{197,198} y el pico 6 fue identificado como PC-2. Es importante que, de los tres estándares de fitoquelatinas utilizadas en la asignación de los picos (PC-2, PC-3, PC-4), solamente se identificó la forma PC-2, cuya presencia fue confirmada mediante el método de adición de estándar (Fig. 8b).

Parece interesante que, en los extractos de cultivos controles se detectaron bajos niveles de PC-2, lo que sugiere presencia de iones metálicos en reactivos y soluciones utilizadas para el crecimiento. Por otro lado, al comparar los cromatogramas de cultivos controles con cultivos expuestos al cadmio, se observa claramente mayor concentración de PC-2 en los últimos. Estos resultados demuestran que el ión cadmio induce PC-2 en diferentes cepas de levaduras. Los resultados cuantitativos obtenidos en 5 cepas del estudio se presentan en la Tabla 13. Es de notar que las cepas estudiadas presentaron diferente habilidad de inducir las fitoquelatinas: la mayor inducción de PCs se observó en *Saccharomyces c.* y *Kluyveromyces m.*, mientras que el incremento de la concentración de PC-2 en *Candida m.* fue significativamente menor.

Tabla 13 Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestas a ión cadmio ($\mu\text{g/g}$ – microgramos de PC-2 por 1 gramo de biomasa liofilizada). La cuantificación se llevó a cabo indirectamente, en base a la señal de glutatona.

Cepa	PC-2, $\mu\text{g/g}$		Inducción de PCs*, %
	Control	Cd(II)	
<i>Saccharomyces c.</i>	33.10	124.4	376
<i>Saccharomyces b.</i>	37.62	104.9	279
<i>Candida m.</i>	41.41	70.20	169
<i>Kluyveromyces m.</i>	32.44	114.3	352
<i>Yarrowia l.</i>	32.44	90.80	280

* - concentración de PC-2 en cultivo expuesto a Cd(II) dividido por la concentración de PC-2 en cultivo control en por ciento.

Los resultados obtenidos en el análisis de levaduras expuestas a arsénico, se presentan en la Figura 9 y en Tabla 14. En la Figura 9 se observa claramente la

inducción de PC-2 en cultivos expuestos a As(III) durante su crecimiento. Sin embargo, el aumento de niveles de PC-2 en cultivos expuestos respecto el control fue menor en comparación con los observados en la exposición a ión cadmio (Tabla 13 y Tabla 14).

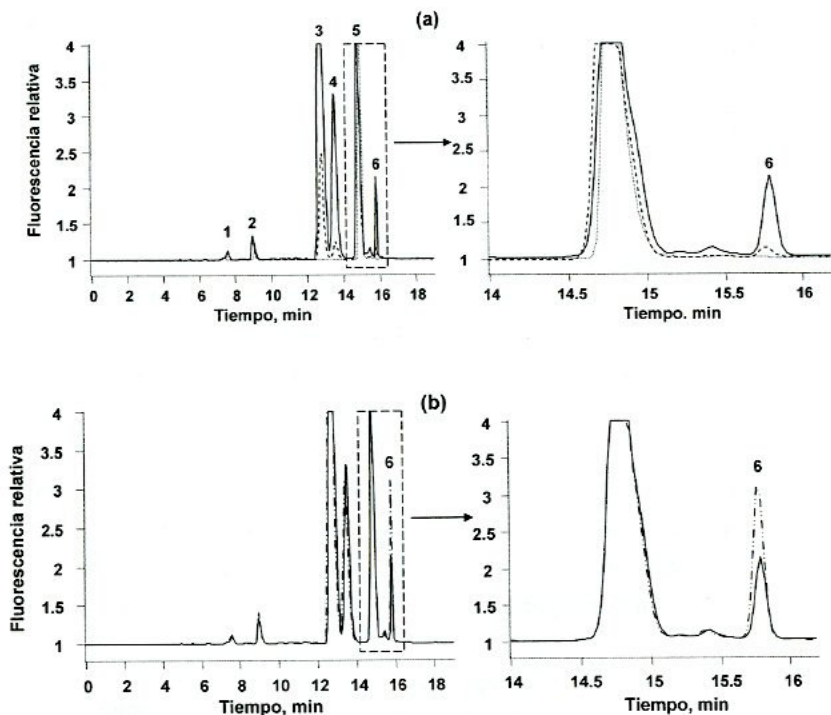


Figura 8. Típicos cromatogramas de extractos de *Kluveromyces marxianus*:

(a) (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg/L de Cd(II) en el medio de crecimiento;

(b) (—) cepa expuesta a 5 mg/L de Cd(II) en el medio de crecimiento; (---) adición de estándar (PC-2) al extracto de cepa expuesta a Cd(II).

Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – estándar interno; 3 – glutatona; 4 – γ -glutamilcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.

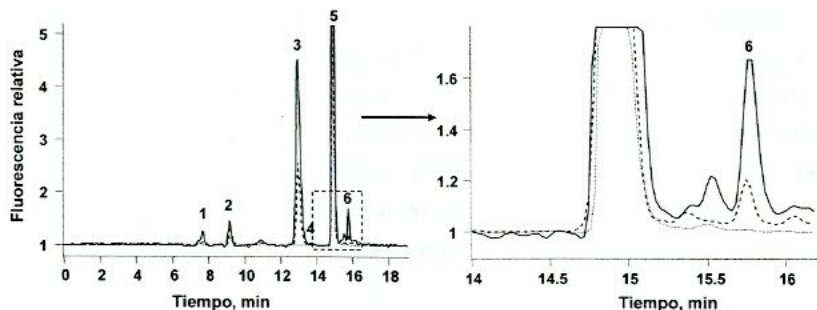


Figura 9. Típicos cromatogramas de extractos de *Candida maltosa*: (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg/L de As(III) en el medio de crecimiento. Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – estándar interno; 3 – glutatona; 4 - γ -glutamilcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.

Tabla 14 Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestos a ión AS(III) ($\mu\text{g/g}$ – microgramos de PC-2 por 1 gramo de biomasa liofilizada). La cuantificación se llevó a cabo indirectamente, en base a la señal de glutatona.

Cepa	PC-2, $\mu\text{g/g}$		Inducción de PCs*, %
	Control	As(III)	
<i>Saccharomyces c.</i>	33.10	85.28	258
<i>Saccharomyces b.</i>	37.62	86.90	231
<i>Candida m.</i>	41.41	86.48	209
<i>Kluyveromyces m.</i>	32.44	88.79	271
<i>Yarrowia l.</i>	32.44	54.43	168

* - concentración de PC-2 en cultivo expuesto a As(III) dividido por la concentración de PC-2 en cultivo control en por ciento.

Para los dos iones del estudio (Cd(II) y As(III)), *Saccharomyces c.* presentaron mayor habilidad de inducción de fitoquelatinas. En exposición a cadmio, la cepa que presentó más bajos niveles de PC-2 fue *Candida maltosa* y en la exposición a arsénico, fue la cepa *Yarrowia lipolitica*. Los resultados obtenidos sugieren que la inducción de fitoquelatinas presenta diferencias, dependiendo del tipo de cepa y también del tipo de ión metálico y/o metaloide. Se demostró sin embargo que, cada una de las cepas de levaduras estudiadas es capaz de biosintetizar fitoquelatinas en respuesta a presencia de Cd(II) y As(III) en medio de cultivo.

Capítulo 5
Conclusiones

5. Conclusiones

En este trabajo se estudió la incorporación de selenio en las bacterias *Lactobacillus in vivo* y, para los fines comparativos, en cinco diferentes cepas de levaduras. Una vez demostrada su habilidad para acumular selenio, estos microorganismos fueron utilizados como modelos biológicos para evaluar posibles efectos de la exposición a los elementos considerados como tóxicos. Los resultados obtenidos en el desarrollo experimental permitieron formular una serie de conclusiones que se presentan a continuación:

1. Se establecieron las condiciones de crecimiento de bacterias lácticas en medio líquido MLC. En los experimentos con diferentes productos comerciales se demostró que, algunos de los productos comerciales de leche fermentada pueden ser una buena fuente de bacterias lácticas.
2. Un importante factor limitante de la incorporación de selenio en las LAB ha sido la reducción masiva de Se(IV), observada en la mayoría de los cultivos.
3. Las bacterias provenientes de la bebida Bonacult (cepa *Lactobacillus casei rhamnosus*) presentaron mayor capacidad de la incorporación del selenio a la biomasa. En estudios sistemáticos se seleccionaron las condiciones de incorporación, que garantizaron un buen crecimiento de las bacterias y relativamente buena eficacia de incorporación de selenio. En breve, durante 9 días de crecimiento, cada 24 hrs el cultivo se colocaba en un medio MLC fresco, aumentando gradualmente la concentración de Se(IV) (desde 0 hasta 2.5 mg/L de Se).
4. Los resultados del análisis total de selenio en la biomasa de bacterias y en el extracto enzimático (pepsina, pH 1.0) revelaron que, la cepa de bacterias provenientes de Bonacult es capaz de incorporar selenio en cantidades

apreciables (405 µg por 1 g de biomasa liofilizada), de los cuales aprox. 50 % podía ser "biodisponible" en las condiciones del tracto digestivo.

5. Los experimentos con cinco cepas de levaduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolitica*, *Candida maltosa*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*) revelaron diferente capacidad de estas cepas para acumular el selenio. Además, el proceso de incorporación resultó depender fuertemente de la concentración de Se(IV) en el medio de cultivo (excepto *Saccharomyces b.*). De acuerdo con los reportes anteriores, se observó buena tolerancia de la cepa utilizada comercialmente (*Saccharomyces c.*) a relativamente altas concentraciones de selenio en el medio^{3,9,74,75,81,97-99}. Parece interesante, que la concentración de selenio en la biomasa de *Saccharomyces b.* permaneció constante, independientemente de la concentración de selenio en el medio (10 – 50 mg/L). Puesto que esta concentración (1790 µg/g) es mayor respecto a las observadas en la cepa comercial en presencia de 10 y 25 mg/L de selenio en el medio, las *Saccharomyces b.* podrían ser una interesante alternativa para la producción de suplementos nutricionales.

6. En general, las levaduras presentaron mayor tolerancia a Se(IV) respecto a las bacterias lácticas y no provocaron la reducción masiva de selenio en el medio de crecimiento. En otras palabras, en cultivos de levaduras se podían utilizar mayores concentraciones de Se(IV) (hasta 50 mg/L), mientras que los cultivos de bacterias toleraban concentraciones significativamente menores (hasta 2.5 mg/L). Sin embargo, la cantidad de selenio incorporado por *Saccharomyces c.* en presencia de 10 mg/L de selenio en el medio (concentración de selenio total en biomasa 13.2 µg/g) fue significativamente inferior respecto a la cantidad incorporada a bacterias provenientes de Bonacult en presencia de 2.5 mg/L de selenio en el medio (405 µg/g). Estos resultados son alentadores en el contexto de posible uso de las bacterias LAB como suplementos de selenio. Sin embargo, se requieren más estudios enfocados en la búsqueda de cepas LAB que toleren

mayores concentraciones de Se(IV) y en la optimización de las condiciones de crecimiento.

7. El estudio analítico del posible efecto protector del selenio contra la toxicidad de cadmio en LAB consistió en: (i) evaluación del crecimiento de biomasa mediante medición de la densidad óptica de cultivos (absorbancia en 600 nm), (ii) ensayo de viabilidad de las células y/o estrés oxidativo, basado en la reducción de MTT en los cultivos y (iii) evaluación del estado de estrés oxidativo empleando un micro ensayo extracto – espectrofotométrico para la determinación de malondialdehído, considerado como biomarcador de peroxidación lipídica. Los resultados obtenidos en cultivos expuestos a Cd(II) indicaron que, la toxicidad de cadmio se manifiesta en el aumento del estado de estrés oxidativo en bacterias y en inhibición de su crecimiento. Se demostró que, en presencia de Se(IV) los dos efectos adversos de cadmio son menos marcados, confirmando el efecto protector de selenio contra la toxicidad de Cd(II).

8. En cinco cepas de levaduras se investigó la inducción de fitoquelatinas en presencia de iones de Cd(II) y As(III). La novedad de esta parte consiste en modificación del procedimiento analítico (condiciones de la extracción, de la reacción de derivatización con monobromobimano, selección de la columna, fases móviles, de las condiciones de elución y de detección) lo que permitió resolución de los compuestos de interés (cisteína, N-acetilcisteína, glutatión, γ -glutamilcisteína y estándares de fitoquelatinas) en un corto tiempo (20 min respecto 70 min reportados anteriormente). Por otra parte, utilizando esta metodología analítica se demostró que, cada una de las cepas de levaduras estudiadas es capaz de biosintetizar fitoquelatinas en respuesta a la presencia de Cd(II) y As(III) en el medio de cultivo. La inducción de PC-2 en cultivos expuestos a Cd(II) fue mayor en comparación con la inducción observada en cepas expuestas a As(III). Para los dos iones del estudio (Cd(II) y As(III)), las *Saccharomyces c.* presentaron mayor habilidad de inducción de fitoquelatinas. En exposición a cadmio, la cepa que presentó más bajos niveles de PC-2 fue

Candida maltosa y en la exposición a arsénico, fue la cepa *Yarrowia lipolytica*. Los resultados obtenidos sugieren que la inducción de fitoquelatinas presenta diferencias, dependiendo del tipo de cepa y también del tipo de ión metálico y/o metaloide.

Finalmente es importante resaltar la contribución original del trabajo:

1. Se demostró que, la selección oportuna, desarrollo, adaptación y aplicación de procedimientos analíticos complementarios en el análisis de microorganismos permite obtener información de la relevancia biológica y, de esta manera, contribuir en el mejor entendimiento de las rutas metabólicas y funciones específicas de elementos metálicos y metaloides en organismos vivos.
2. Se obtuvo las evidencias experimentales de la incorporación de selenio en bacterias de tipo *Lactobacillus*.
3. En base a la comparación de LAB y de levaduras en términos de su tolerancia a Se(IV) y de capacidad de su acumulación se propuso que, las bacterias fortalecidas podrían ser consideradas como una fuente nutricional alternativa de este oligoelemento.
4. Se obtuvo las evidencias experimentales sobre el efecto protectorio de selenio contra la toxicidad de cadmio en LAB.
5. Se demostró la capacidad de las cinco cepas de levaduras para biosíntesis de fitoquelatinas en respuesta a su exposición a los iones Cd(II) y As(III).

Bibliografía

6. Bibliografia

- (1) Clark, L. C.; Turnball, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, D. K.; Gross, E. G.; Krongrad, A.; Leshner, J. L.; Park, H. K.; Sanders, B. B.; Smith, C. L.; Taylor, J. R.; Alberts, D. S.; Allison, R. J.; Bradshaw, J. C.; Curtus, D.; Deal, D. R.; Dellasega, M.; Hendrix, J. D.; Herlong, J. H.; Hixon, L. J.; Knight, J.; Moore, J.; Rice, J. S.; Rogers, A. I.; Schuman, B.; Smith, E. H.; Woodward, J. C. *J Am Med Assoc* **1996**, 276, 1957-1963.
- (2) Whanger, P. D.; Ip, C.; Polan, C. E.; Uden, P. C.; Welbaum, G. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 5723-5730.
- (3) Ip, C.; Birringer, M.; Block, E.; Kotrebai, M.; Tyson, J. F.; Uden, P. C.; Lisk, D. J. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 2062-2070.
- (4) Rayman, N. P. *Lancet* **2000**, 356, 233-241.
- (5) Combs, G. F. J. *Br J Cancer* **2004**, 19, 195-199.
- (6) Suzuki, K. T.; Ogra, Y. *Food Addit Contam* **2002**, 19, 974-983.
- (7) Whanger, P. D. *Br J Nutr* **2004**, 91, 11-28.
- (8) B'Hymer, C.; Caruso, J. A. *J Anal At Spectrom* **2000**, 15, 1531-1539.
- (9) Kotrebai, M.; Birringer, M.; Tyson, J. F.; Block, E.; Uden, P. C. *Analyst* **2000**, 125, 71-78.
- (10) Ponce de Leon, C. A., Montes-Bayon, M., Paquin, C., Caruso, J.A. *Journal of Applied Microbiology* **2002**, 92, 602-610.
- (11) Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; Caruso, J. A. *Anal Bioanal Chem* **2003**, 375, 133-138.
- (12) Larsen, E. H.; Hansen, M.; Paulin, H.; Moesgaard, S.; Reid, M.; Rayman, M. *J AOAC Int* **2004**, 87, 225-232.
- (13) Ip, C.; Hayes, C.; Budnick, R. M.; Ganther, H. E. *Cancer Res* **1991**, 51, 595.
- (14) DeNicola Caffery, K.; Richardson, D. D.; Caruso, J. A. *Spectroscopy* **2006**, 21, 18-24.
- (15) Whanger, P. D. *J Am Coll Nutr* **2002**, 21, 223-232.
- (16) Foster, L. H.; Sumar, S. *Nutr Food Sci* **1995**, 5, 17-23.
- (17) Reilly, C. *Trends in Food Sci Technol* **1998**, 9, 114-118.
- (18) Ihnat, M. *Ocurrence and distribution of selenium*; CRC Press: Canada, 1989.
- (19) Schwarz, K.; Stesney, J. A.; Foltz, C. M. *Metabolism* **1959**, 8, 88-90.
- (20) Clark, L. C.; Turnball, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, D. K.; Gross, E. G.; Krongrad, A.; Leshner, J. L.; Park, H. K.; Sanders, B. B.; Smith, C. L.; Taylor, J. R.; Alberts, D. S.; Allison, R. J.; Bradshaw, J. C.; Curtus, D.; Deal, D. R.; Dellasega, M.; Hendrix, J. D.; Herlong, J. H.; Hixon, L. J.; Knight, J.; Moore, J.; Rice, J. S.; Rogers, A. I.; Schuman, B.; Smith, E. H.; Woodward, J. C. *J Am Med Assoc* **1996**, 276, 1957.
- (21) Bjorkhem-Bergman, L.; Torndal, U. B.; Eken, S.; Nystrom, C.; Capitanio, A.; Larsen, E. H.; Bjornstedt, M.; Eriksson, L. C. *Carcinogenesis* **2005**, 26, 125-131.

- (22) Cabanero, A. I.; Carvalho, C.; Madrid, Y.; Batoreu, C.; Camara, C. *Biol Trace Elem Res* **2005**, *103*, 17-35.
- (23) Wada, O.; Kurihara, N.; Yamazaki, N. *Jap J Nutr Assess* **1993**, *10*, 199.
- (24) Arthur, J. R. *Proc Nutr Soc* **2003**, *62*, 393-397.
- (25) Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 3565-3576.
- (26) Kryukov, G. V.; Gladyshev, V. N. *Methods Enzymol* **2002**, *347*, 84-100.
- (27) Stadtman, T. C. *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 83-100.
- (28) Ganther, H. E. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1657.
- (29) Andoh, A.; Hirashima, M.; Maeda, H.; Hata, K.; Inatomi, O.; Tsujikawa, T.; Sasaki, M.; Takahashi, K.; Fujiyama, Y. *Nutrition* **2005**, *21*, 574-579.
- (30) Kim, Y. Y.; Mahan, D. C. *J Anim Sci* **2001**, *79*, 956-966.
- (31) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. In *The analysis of chemical elements in food: Applications for atomic mass spectrometry*; Caroli, S., Ed.; Wiley & Sons, 2006, pp en prensa.
- (32) Combs, G. F. *British J Nutr* **2001**, *85*, 517-547.
- (33) Rayman, M. P. *Br J Nutr* **2004**, *92*, 557-573.
- (34) Suzuki, K. T.; Kurasaki, K.; Okazaki, N.; Ogra, Y. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2005**, *206*, 1-8.
- (35) Yoneda, S.; Suzuki, K. T. *Toxicol Appl Pharmacol* **1997**, *143*, 274-280.
- (36) Suzuki, K. T.; Ogra, Y. *Biomed Res Trace Elem* **1999**, *10*, 95.
- (37) Fishbein, L. *Int J Environ Anal Chem* **1984**, *17*, 113-170.
- (38) McKenzie, R. C.; Arthur, J. R.; Miller, S.; Rafferty, T. S.; Beckett, G. J. In *Nutrition and immune function*; Hill, H. S., Ed.; CABI/Nutrition Society: Wallingford, 2002, pp 229-250.
- (39) Anonymous *Nutr Rev* **1989**, *47*, 173-175.
- (40) Sanz Alaejos, M.; Diaz Romero, F. J.; Diaz Romero, C. *Nutrition* **2000**, *16*, 376-383.
- (41) Kim, Y. Y.; Mahan, D. C. *J Anim Sci* **2001**, *79*, 942-948.
- (42) Schrauzer, G. N. *J Nutr* **2000**, *130*, 1653-1656.
- (43) Schrauzer, G. N. *Adv Food Nutr Res* **2003**, *47*, 73-112.
- (44) Gammelgaard, B.; Bendahl, L. *J Anal At Spectrom* **2004**, *19*, 135-142.
- (45) Block, E.; Birringer, M.; Jiang, W.; Nakahodo, T.; Thompson, H. J.; Toscano, P. J.; Uzar, H.; Zhang, X.; Zhu, Z. *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 458-470.
- (46) Das, A.; Desai, D.; Pittman, B.; Amin, S.; El-Bayoumy, K. *Nutr Cancer* **2003**, *46*, 179-185.
- (47) Guttenplan, J. B.; Spratt, T. E.; Khmelnitsky, M.; Kosinska, W.; Desai, D.; El-Bayoumy, K. *Mutat Res* **2004**, *559*, 199-210.
- (48) Vonderheide, A. P.; Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; B'Hymer, C.; Montes-Bayon, M.; Ponce De Leon, C.; Caruso, J. A. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 5722-5728.
- (49) Chang, J. C.; Gutenmann, W. H.; Reid, C. M.; Lisk, D. J. *Chemosphere* **1995**, *30*, 801-902.
- (50) Ip, C.; Lisk, D. J.; Stoewsand, G. S. *Nutr Cancer* **1992**, *17*, 279-286.
- (51) Ip, C.; Lisk, D. J. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 1881-1885.
- (52) B'Hymer, C.; Caruso, J. A. *J Anal At Spectrom* **2000**, *15*, 1531-1539.

- (53) Lintschinger, J.; Fuchs, N.; Moser, J.; Kuehnelt, D.; Goessler, W. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 5362-5368.
- (54) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; Caruso, J. A.; Wysocka, I. A.; Butska, E.; Swiatek, J.; Wierzbicka, M. *Food Chem* **2004**, *86*, 617-623.
- (55) Shah, M.; Kannamkumarath, S. S.; Wuilloud, J. C. A.; Wuilloud, R. G.; Caruso, J. A. *J Anal At Spectrom* **2004**, *19*, 381-386.
- (56) Larsen, E. H.; Sloth, J.; Hansen, M.; Moesgaard, S. *J Anal At Spectrom* **2003**, *18*, 310-316.
- (57) Schrauzer, G.N. *Elements and their compounds in the environment*; Wiley & Sons: Weinheim, Germany, 2004.
- (58) Quevauviller, P. In *Elemental Speciation. New Approaches for Trace Element Analysis*; Ackley, K. L., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2000, pp 531.
- (59) Slavin, W. *Graphite furnace AA, a source book*; Perkin-Elmer, 1991.
- (60) Schrauzer, G. N. In *Elements and their compounds in the environment*; Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoepler, M., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004; Vol. 3, pp 1365-1394.
- (61) Michalke, B. *Ecotoxicol Environ Saf* **2003**, *56*, 122-139.
- (62) Anderson, S. L.; Pergantis, S. A. *Talanta* **2003**, *60*, 821-830.
- (63) Lim, T. T.; Goh, K. H. *Chemosphere* **2005**, *58*, 91-101.
- (64) Renard, N. E.; Tompkins, T. A. *Biol Trace Elem Res* **2002**, *88*, 185-191.
- (65) Cornelis, R. *Analyst* **1992**, *117*, 583-588.
- (66) de Goeij, J. J.; Cornelis, R. *Biol Trace Elem Res* **1999**, *71-72*, 399-405.
- (67) Wrobel, K.; Lopez de Alba, P. L.; Wrobel, K.; Lopez Martinez, L.; Pantoja Villagomez, L. E. *Aquatic Ecosystem Health & Management* **2001**, *4*, 209-213.
- (68) Kannamkumarath, S. S.; Wrobel, K.; Vonderheide, A.; Caruso, J. A. *Anal Bioanal Chem* **2002**, *373*, 454-460.
- (69) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. *J Anal At Spectrom* **2002**, *17*, 1048-1054.
- (70) C. Casiot, J. S., R. Lobinski, M. Potin-Gautier *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, 645-650.
- (71) Onning, G.; Bergdahl, I. A. *Analyst* **1999**, *124*, 1435-1438.
- (72) Monicou, S.; Meija, J.; Caruso, J. A. *Analyst* **2004**, *129*, 116-123.
- (73) Montes Bayon, M.; Grant, T. D.; Meija, J.; Caruso, J. A. *J Anal At Spectrom* **2002**, *17*, 1015-1023.
- (74) Bird, S. M.; Uden, P. C.; Tyson, J. F.; Block, E.; Denoyer, E. *J Anal At Spectrom* **1997**, *12*, 785-788.
- (75) Kotrebai, M.; Birringer, M.; Tyson, J. F.; Block, E.; Uden, P. C. *Anal Commun* **1999**, *36*, 249-252.
- (76) Larsen, E. H.; Hansen, M.; Fan, T.; Vahl, M. *J Anal At Spectrom* **2001**, *16*, 1403-1408.
- (77) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *381*, 317-331.
- (78) Serafin Muñoz, A. H.; Kubachka, K.; Wrobel, K.; Gutierrez Corona, F. J.; Yathavakilla, S. K. V.; Caruso, J. A.; Wrobel, K. *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, 3440-3444.

- (79) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. *J Anal At Spectrom* **2002**, *17*, 1048-1054.
- (80) Diaz-Huerta, V.; Hinojosa Reyes, L.; Marchante-Gayon, J. M.; Fernandez-Sanchez, M. L.; Sanz-Medel, A. *J Anal At Spectrom* **2003**, *18*, 1243-1247.
- (81) Bird, S. M.; Ge, H.; Uden, P. C.; Tyson, J. F.; Block, E.; Denoyer, E. *J Chromatogr A* **1997**, *789*, 349-359.
- (82) Goessler, W.; Kuehnelt, D.; Schlagenhauen, C.; Slejkovec, Z.; Irgolic, K. J. *J Anal At Spectrom* **1998**, *13*, 183.
- (83) Montes-Bayon, M.; DeNicola, K.; Caruso, J. A. *J Chromatogr A* **2003**, *1000*, 457-476.
- (84) Sloth, J. J.; Larsen, E. H. *J Anal At Spectrom* **2000**, *15*, 669-672.
- (85) Marchante Gayón, J. M.; Thomas, C.; Feldmann, I.; Jakubowski, N. *J Anal At Spectrom* **2000**, *15*, 1093-1102.
- (86) Kotrebai, M.; Tyson, J. F.; Block, E.; Uden, P. C. *J Chromatogr A* **2000**, *866*, 51-63.
- (87) Szpunar, J.; Lobinski, R. *Anal Bioanal Chem* **2002**, *373*, 404-411.
- (88) McSheehy, S.; Yang, W.; Pannier, F.; Szpunar, J.; Lobinski, R.; Auger, J.; Potin-Gautier, M. *Anal Chim Acta* **2000**, *421*, 147-153.
- (89) McSheehy, S.; Pohl, P.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R. *J Anal At Spectrom* **2001**, *16*, 68-73.
- (90) Gammelgaard, B.; Madsen, A. D.; Bjerrum, J.; Bendhal, L.; Jons, O.; Olsen, J.; Sidenius, U. *J Anal At Spectrom* **2003**, *18*, 65-70.
- (91) Lindemann, T.; Hintelmann, H. *Anal Chem* **2002**, *74*, 4602-4610.
- (92) Chassaigne, H.; Chery, C. C.; Bordin, G.; Rodriguez, A. R. *J Chromatogr A* **2002**, *976*, 409-422.
- (93) Jacobson, G. A.; Featherstone, A. M.; Townsend, A. T.; Lord, R.; Peterson, G. M. *Biol Trace Elem Res* **2005**, *107*, 213-220.
- (94) Casiot, C.; Vacchina, V.; Chassaigne, H.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R. *Anal Commun* **1999**, *36*, 77-80.
- (95) Uden, P. C.; Bird, S. M.; Kotrebai, M.; Nolibos, P.; Tyson, J. F.; Block, E.; Denoyer, E. *Fresenius J Anal Chem* **1998**, *362*, 447-456.
- (96) Roberge, M. T.; Borgerding, A. J.; Finley, J. W. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 4191-4197.
- (97) Kotrebai, M.; Bird, S. M.; Tyson, J. F.; Block, E.; Uden, P. C. *Spectrochim Acta Part B* **1999**, *54*, 1573-1591.
- (98) Zheng, J.; Ohata, M.; Furuta, N.; Kosmus, W. *J Chromatogr A* **2000**, *874*, 55-64.
- (99) Yoshida, M.; Sugihara, S.; Suenaga, T.; Naito, C.; Fukunaga, K.; Tsuchita, H. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **2002**, *48*, 401-404.
- (100) Capelo, J. L.; Ximenez-Embun, P.; Madrid-Albarran, Y.; Camara, C. *Anal Chem* **2004**, *76*, 233-237.
- (101) Chéry, C. C.; Gunther, D.; Cornelis, R.; Vanhaecke, F.; Moens, L. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3305-3313.
- (102) Encinar, J. R.; Ruzik, R.; Buchman, W.; Tortajada, J.; Lobinski, R.; Szpunar, J. *Analyst* **2003**, *128*, 220-224.
- (103) Encinar, J. R.; Ouerdane, L.; Buchmann, W.; Tortajada, J.; Lobinski, R.; Szpunar, J. *Anal Chem* **2003**, *75*, 3765-3774.

- (104) Encinar, J. R.; Sliwka-Kaszynska, M.; Polatajko, A.; Vacchina, V.; Szpunar, J. *Anal Chim Acta* **2003**, *500*, 171-183.
- (105) Devos, C.; Sandra, K.; Sandra, P. *J Pharm Biomed Anal* **2002**, *27*, 507-514.
- (106) Stadlober, M.; Sager, M.; Irgolic, K. J. *Food Chem* **2001**, *73*, 357-366.
- (107) El-Bayoumy, K.; Richie, J. P., Jr.; Boyiri, T.; Komninou, D.; Prokopczyk, B.; Trushin, N.; Kleinman, W.; Cox, J.; Pittman, B.; Colosimo, S. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2002**, *11*, 1459-1465.
- (108) Chery, C. C.; Chassaing, H.; Verbeeck, L.; Cornelis, R.; Vanhaecke, F.; Moens, L. *J Anal At Spectrom* **2002**, *17*, 576-580.
- (109) McSheehy, S.; Pannier, F.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R. *Analyst* **2002**, *127*, 223-229.
- (110) Jakubowski, N.; Stuewer, D.; Klockow, D.; Thomas, C.; Emons, H. *J Anal At Spectrom* **2001**, *16*, 135-139.
- (111) Ray, S. J.; Andrade, F.; Gamez, G.; McClenathan, D.; Rogers, D.; Schilling, G.; Wetzel, W.; Hieftje, G. M. *J Chromatogr A* **2004**, *1050*, 3-34.
- (112) Szpunar, J. *Analyst* **2005**, *130*, 442-465.
- (113) Gómez-Ariza, J. L.; García-Barrera, T.; Lorenzo, F.; Bernal, V.; Villegas, M. J.; Olivera, V. *Anal Chim Acta* **2005**, *524*, 15-22.
- (114) Hasegawa, T.; Asano, M.; Takatani, K.; Matsuura, H.; Umemura, T.; H., H. *Talanta* **2005**, *68*, 465-469.
- (115) Jakubowski, N.; Lobinski, R.; Moens, L. *J Anal At Spectrom* **2004**, *19*, 1-4.
- (116) Serafin Muñoz, A. H.; Kubachka, K.; Wrobel, K.; Yathavakilla, S. K. V.; Gutierrez Corona, F.; Caruso, J. A.; Wrobel, K. *J Agric Food Chem* **2005**, *53*, 5138-5143.
- (117) Mounicou, S.; Shah, M.; Meija, J.; Caruso, J. A.; Vonderheide, A. P.; Shann, J. *J Anal At Spectrom* **2006**, *21*, 404-412.
- (118) Burrows, W. W. *B. Saunders Company USA* **1968**, *99 ed*, 974 pages.
- (119) Schrezenmeir, J.; de Vrese, M. *Am J Clin Nutr* **2001**, *73 (suppl)*, 361S-364S.
- (120) Gill, H.; Guarner, F. *Postgrad Med J* **2004**, *80*, 516-526.
- (121) Holzapfel, W.; Haberer, P.; Geisen, R.; Bjorkroth, J.; Schillinger, U. *Am J Clin Nutr* **2001**, *73(suppl)*, 365S-373S.
- (122) Yanagida, F.; Chen, Y.-s.; Shinohara, T. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2005**, *51*, 313-318.
- (123) Somboon, T.; Okada, S.; Komagata, K. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1998**, *44*, 193-200.
- (124) Miyamoto, M.; Seto, Y.; Hao, D.; Teshima, T.; Sun, Y.; Kabuki, T.; Yao, L.; Nakajima, H. *Syst Appl Microbiol.* **2005**, *28*, 688-694.
- (125) Kim, B.; Lee, J.; Jang, J.; Kim, J.; Han, H. *Int J Syst Evol Microbiol* **2003**, *53*, 1123-1126.
- (126) Davidson, R.; Duncan, S.; Hackney, C.; Eigel, W.; Boling, J. *J Dairy Sci* **2000**, *83*, 666-673.
- (127) Robinson, R. K.; Batt, C. A.; Patel, P. D. *Academic Press* **2000**, *2*.
- (128) Ellner, R. *Editorial Díaz de Santos, S. A.* **2000**, *1 ed. en español*.
- (129) Goldin, B. R.; Gorbach, S. L.; Saxelin, M.; Barakat, S.; Gualtieri, L.; Salminen, S. *Dig Dis Sci* **1992**, *37*, 121-128.
- (130) Saxelin, M.; Pessi, T.; Salminen, S. *Int J Food Microbiol* **1995**, *25*, 199-203.

- (131) Conway, P.; Gorbach, S.; Goldin, B. *J Dairy Sci* **1987**, *70*, 1-12.
- (132) Juntunen, M.; Kirjavainen, P.; Ouwehand, A.; Salminen, S.; Isolauri, E. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2001**, *8*, 293-296.
- (133) Kirjavainen, P. V.; Ouwehand, A. C.; Isolauri, E.; Salminen, S. *J. FEMS Microbiol Lett* **1998**, *167*, 185-189.
- (134) Tuomola, E. M.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S. *J. Lett Appl Microbiol* **1999**, *28*, 159-163.
- (135) Ouwehand, A. C.; Salminen, S.; Tölkö, S.; Roberts, P.; Ovaska, J.; Salminen, E. R. *Clin Diagn Lab Immunol* **2002**, *9*, 184-186.
- (136) Sarem-Damerdj, L.; Sarem, F.; Marchal, L.; Nicolas, J. P. *FEMS Microbiol Lett* **1995**, *131*, 133-137.
- (137) Coconnier, M.-H.; Lievin, V.; Lorrot, M.; Servin, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1152-1157.
- (138) Hudault, S.; Lievin, V.; Bernet-Camard, M. F.; Servin, A. L. *Appl Environ Microbiol* **1997**, *63*, 513-518.
- (139) Sreekumar, O.; Hosono, A. *J Dairy Sci* **2000**, *83*, 931-939.
- (140) Lee, D. J.; Drongowski, R. A.; Coran, A. G.; Harmon, C. M. *Pediatr Surg Int* **2000**, *16*, 237-242.
- (141) Mack, D. R.; Michail, S.; Wei, S.; McDougall, L.; Hollingsworth, M. A. *Am J Physiol* **1999**, *276*, G941-950.
- (142) Mattar, A. F.; Drongowski, R. A.; Coran, A. G.; Harmon, C. M. *Pediatr Surg Int* **2001**, *17*, 265-268.
- (143) Coconnier, M.-H.; Lievin, V.; Hemery, E.; Servin, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4573-4580.
- (144) Sgouras, D.; Maragkoudakis, P.; Petraki, K.; Martinez-Gonzalez, B.; Eriotou, E.; Michopoulos, S.; Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E.; Mentis, A. *Appl Environ Microbiol* **2004**, *70*, 518-526.
- (145) Vanderhoof, J. A.; Whitney, D. B.; Antonson, D. L.; Hanner, T. L.; Lupo, J. V.; Young, R. J. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1999**, *135*, 564-568.
- (146) Arvola, T.; Laiho, K.; Torkkeli, S.; Mykkänen, H.; Salminen, S.; Maunula, L.; Isolauri, E. *Pediatrics* **1999**, *104*, e64.
- (147) Siitonen, S.; Vapaatalo, H.; Salminen, S.; Gordin, A.; Saxelin, M.; Wikberg, R.; Kirkkola, A. L. *Ann Med* **1990**, *22*, 57-59.
- (148) de Roos, N. M.; Katan, M. B. *Am J Clin Nutr* **2000**, *71*, 405-411.
- (149) Coconnier, M. H.; Lievin, V.; Bernet-Camard, M. F.; Hudault, S.; Servin, A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41*, 1046-1052.
- (150) Bernet, M. F.; Brassart, D.; Neeser, J. R.; Servin, A. *Gut* **1994**, *35*, 483-489.
- (151) Tejada-Simon, M. V.; Lee, J. H.; Ustunol, Z.; Pestka, J. J. *J. Dairy Sci.* **1999**, *82*, 649-660.
- (152) Perdigon, G.; Vintini, E.; Alvarez, S.; Medina, M.; Medici, M. *J. Dairy Sci.* **1999**, *82*, 1108-1114.
- (153) Ogawa, M.; Shimizu, K.; Nomoto, K.; Takahashi, M.; Watanuki, M.; Tanaka, R.; Tanaka, T.; Hamabata, T.; Yamasaki, S.; Takeda, Y. *Infect Immun* **2001**, *69*, 1101-1108.
- (154) de Waard, R.; Garssen, J.; Snel, J.; Bokken, G. C.; Sako, T.; Veld, J. H.; Vos, J. G. *Clin Diagn Lab Immunol* **2001**, *8*, 762-767.

- (155) Yasui, H.; Kiyoshima, J.; Hori, T. *Clin Diagn Lab Immunol* **2004**, *11*, 675-679.
- (156) Hori, T.; Kiyoshima, J.; Shida, K.; Yasui, H. *Clin Diagn Lab Immunol* **2001**, *8*, 593-597.
- (157) Hori, T.; Kiyoshima, J.; Shida, K.; Yasui, H. *Clin Diagn Lab Immunol* **2002**, *9*, 105-108.
- (158) Miettinen, M.; Vuopio-Varkila, J.; Varkila, K. *Infect Immun* **1996**, *64*, 5403-5405.
- (159) Miettinen, M.; Matikainen, S.; Vuopio-Varkila, J.; Pirhonen, J.; Varkila, K.; Kurimoto, M.; Julkunen, I. *Infect Immun* **1998**, *66*, 6058-6062.
- (160) Miettinen, M.; Lehtonen, A.; Julkunen, I.; Matikainen, S. *J Immunol* **2000**, *164*, 3733-3740.
- (161) Kirjavainen, P. V.; H.S., E.-N.; Salminen, S. J.; Ahokas, J. T.; Wrigh, P. F. *Clin Diagn Lab Immunol* **1999**, *6*, 799-802.
- (162) Kaila, M.; Isolauri, E.; Soppi, E.; Virtanen, E.; Laine, S.; Arvilommi, H. *Pediatr Res* **1992**, *32*, 141-144.
- (163) Kaila, M.; Isolauri, E.; Saxelin, M.; Arvilommi, H.; Vesikari, T. *Arch Dis Child* **1995**, *72*, 51-53.
- (164) Majamaa, H.; Isolauri, E.; Saxelin, M.; Vesikari, T. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1995**, *20*, 333-338.
- (165) Hatakka, K.; Savilahti, E.; Pönkä, A.; Meurman, J. H.; Poussa, T.; Näse, L.; Saxelin, M.; Korpela, R. *Bmj* **2001**, *322*, 1327 - 1329.
- (166) Matsuzaki, T.; Yamazaki, R.; Hashimoto, S.; Yokokura, T. *J Dairy Sci* **1998**, *81*, 48-53.
- (167) Hilton, E.; Isenberg, H. D.; Alperstein, P.; France, K.; Borenstein, M. T. *Ann Intern Med* **1992**, *116*, 353-357.
- (168) Chou, L.; Weimer, B. *J Dairy Sci* **1999**, *82*, 23-31.
- (169) Alonso, L.; Cuesta, E. P.; Gilliland, S. E. *J Dairy Sci* **2003**, *86*, 1941-1946.
- (170) Takagi, A.; Matsuzaki, T.; Sato, M.; Nomoto, K.; Morotomi, M.; Yokokura, T. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 599-605.
- (171) Ling, W. H.; Korpela, R.; Mykkänen, H.; Salminen, S.; Hänninen, O. *J Nutr* **1994**, *124*, 18-23.
- (172) Lim, B. K.; Mahendran, R.; Lee, Y. K.; Bay, B. H. *Jpn J Cancer Res* **2002**, *93*, 36-41.
- (173) Goldin, B. R.; Gualtieri, L. J.; Moore, R. P. *Nutr Cancer* **1996**, *25*, 197-204.
- (174) Reid, G.; McGroarty, J. A.; Angotti, R.; Cook, R. L. *Can. J. Microbiol* **1988**, *34*, 344-351.
- (175) Boris, S.; Suárez, J.; Vázquez, F.; Barbés, C. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1985-1989.
- (176) Takahashi, T.; Kushiro, A.; Nomoto, K.; Uchida, K.; Morotomi, M.; Yokokura, T.; Akaza, H. *J Urol* **2001**, *166*, 2506-2511.
- (177) Takahashi, T.; Morotomi, M. *J Dairy Sci* **1994**, *77*, 3275-3286.
- (178) Rastall, R. A. *J. Nutr.* **2004**, *134*.
- (179) Calomme, M.; Hu, J.; Van den Branden, K.; Vanden Berghe, D. A. *Biol Trace Elem Res* **1995**, *47*, 379-383.
- (180) [www&profeco.gob.mx/revista/pdf/est_04.asp](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_04.asp).
- (181) Gomes, A.; Malcata, F.; Klaver, F. *J Dairy Sci* **1998**, *81*, 2817-2825.

- (182) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Valtierra Marquez, G. R.; Rodriguez Almanza, M. L. *Biol Trace Elem Res* **1999**, *68*, 97-106.
- (183) Pantoja Villagomez, L. E.; Wrobel, K.; Wrobel, K. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **1998**, *43*, 121-132.
- (184) Serafin Muñoz, A. H.; Gutierrez Corona, F.; Wrobel, K.; Martinez Soto, G.; Wrobel, K. *Biol Trace Elem Res* **2005**, *106*, 265-278.
- (185) Crews, H. M.; Clarke, P. A.; Lewis, D. J.; Owen, L. M.; Strutt, J. M. *J Anal At Spectrom* **1996**, *11*, 1177-1182.
- (186) Wrobel, K.; Colunga Urbina, E. M.; Hinojosa Reyes, L.; Wrobel, K. *Trace Elem. Electrol.* **2001**, *18*, 101-106.
- (187) Golubev, V. I.; Golubev, N. V. *Microbiology* **2002**, *71*, 455-459.
- (188) Clancy, C. J.; Nguyen, M. H. *J Clin Microbiol* **1997**, *35*, 2878-2882.
- (189) Galambos, B.; Csonge, L.; Olah, A.; von Versen, R.; Tamas, L. *Eur Surg Res* **2004**, *36*, 371-375.
- (190) Serafin Muñoz, A. H.; Preciado Puga, M.; Wrobel, K.; Garay Sevilla, M. E.; Wrobel, K. *Microchim Acta* **2004**, *148*, 285-291.
- (191) Savitzky, A.; Golay, M. *Anal Chem* **1964**, *36*, 1627-1634.
- (192) Zamora, R.; Alaiz, M.; Hidalgo, F. J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15765-15771.
- (193) Zenk, M. H. *Gene* **1996**, *179*, 21-30.
- (194) Grill, E. *Experientia Suppl* **1987**, *52*, 317-322.
- (195) Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H. *Methods Enzymol* **1991**, *205*, 333-341.
- (196) Clemens, S.; Kim, E. J.; Neumann, D.; Schroeder, J. I. *Embo J* **1999**, *18*, 3325-3333.
- (197) Kawakami, S. K.; Gledhill, M.; Achterberg, E. P. *Trends Anal Chem* **2006**, *25*, 133-142.
- (198) Sneller, F. E. C.; van Heerwaarden, L. M.; Koevoets, P. L. M.; Vooijs, R.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 4014-4019.
- (199) Wrobel, K.; Wrobel, K.; Landero Figueroa, J. A.; Gutierrez Corona, J. F., Leon, Gto., 5-7 abril, 2006 2006; Universidad de Guanajuato; 25-29.
- (200) Doring, S.; Korhammer, S.; Oetken, M.; Markert, B. *Fresenius J Anal Chem* **2000**, *366*, 316-318.
- (201) Sneller, F. E.; van Heerwaarden, L. M.; Koevoets, P. L.; Vooijs, R.; Schat, H.; Verkleij, J. A. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 4014-4019.
- (202) Sauge-Merle, S.; Cuine, S.; Carrier, P.; Lecomte-Pradines, C.; Luu, D. T.; Peltier, G. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 490-494.